

PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS UND **WILLIAM SEIFRIZ**
NEW YORK PHILADELPHIA

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK UND **FRIEDL WEBER**
ROSTOCK GRAZ

BAND XXXIX, HEFT 2

MIT 62 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 12. APRIL 1950



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1950

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 640 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut,
Graz, Schubertstraße 51, Österreich

oder an

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut,
(3a) Rostock, Universitätsplatz, Deutschland, Russ. Zone

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Kosten für etwa nötige Umzeichnungen werden dem Verfasser in Rechnung gestellt. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist ein Unkostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

Die Aufnahme von Artikeln, welche bereits an anderer Stelle in wörtlich oder auch nur inhaltlich gleicher Fassung publiziert worden sind, wird abgelehnt. „Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Jänner desjenigen Jahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Der Verfasser verpflichtet sich also, innerhalb dieser Frist seinen im Protoplasma abgedruckten Beitrag nicht anderweitig zu veröffentlichen.

Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Die Verfasser erhalten 100 Sonderdrucke ihrer Beiträge kostenlos und können weitere (bis zu 200) gegen angemessene Berechnung beziehen. Unkostensatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Springer-Verlag, Wien I, Mülkerbastei 5

Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien

XXXIX. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft

Abhandlungen

Seite

Pisek, Arthur. Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei <i>Rhododendron ferrugineum</i> , <i>Pinus cembra</i> und <i>Picea excelsa</i>	129
Seemann, Felix. Zur cH-Abhängigkeit der Wasserpermeabilität des Protoplasmas ..	147
Keller, Rudolf. Zur Elektrophysiologie von Drüsenprotoplasma	176
Perner, Ernst S. Die intravitale Aufnahme und Speicherung sulfosaure Fluorochrome durch die obere Zwiebelshuppenepidermis von <i>Allium Cepa</i>	180
Terry, Robert L. The Surface Precipitation Reaction in the Ovarian Frog Egg ..	206
Lepeschkin, W. W. Über die Struktur und den molekularen Bau der lebenden Materie	222
Diannelidis, Themistokles. Plastiden-Rückverlagerung nach Zentrifugierung und Narkose	244
Biebl, Richard. Über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Vanadium	251

Sammelreferat

Michaells, Peter. Grundzüge der intraindividuellen Plasmon-Umkombination	260
--	-----

Kurze Mitteilungen

Mairold, Friedl, und Friedl Weber. Notiz über <i>Cephalanthera Albino</i>	275
---	-----

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*

Von

Arthur Pisek

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Innsbruck)

Mit 6 Textabbildungen

(Eingelangt am 16. Februar 1949)

Aus mehrfachen Untersuchungen, besonders an Kulturgewächsen, ist bekannt, daß in der kalten Jahreszeit mit Zunahme der Frostresistenz auch der osmotische Wert und Zuckergehalt der Pflanzen steigt; sogar sorten- und herkunftsbedingte Unterschiede der Frosthärte spiegeln sich vielfach so getreu in den erwähnten Eigenschaften des Zellsaftes, daß diesen geradezu Zeigerwert in betreff der Resistenz zugesprochen (A k e r m a n n 1927, M a x i m o v 1929, F u c h s 1930, M u d r a 1933, Literaturübersicht bei S t e i n e r 1939) und darauf ein Verfahren der indirekten Resistenzprüfung gegründet wurde, das sich mindestens für Orientierungszwecke bewährt (C h r i s t o f f 1939). Anderseits ließen Reihenanalysen von Preßsäften aus Blättern und Nadeln immergrüner Hölzer allgemein-winterliche Zunahme und sommerlichen Tiefstand des osmotischen Wertes und Zuckerspiegels erkennen (S t e i n e r 1933, P i t t i u s 1935), deren Schwankungen, wie U l m e r (1937) in unmittelbarem Vergleich mit Frosthärtebestimmungen zeigen konnte, der Jahresperiode der Resistenz im wesentlichen parallel laufen. Dies gilt allerdings nur soweit, als die Konzentrationsänderungen des Saftes nicht bloß durch Wasserabgabe und -aufnahme bedingt werden, sondern Vermehrung und Verminderung osmotisch wirksamer Substanz — im allgemeinen der Zucker, bei manchen Arten des Mannits (A s a i 1932, 1937) — im Spiele ist. Auch an gewisse Angaben, wonach künstliche Erhöhung des osmotischen Wertes durch permeierende Stoffe oder durch Plasmolyse (L i d f o r s s 1907, A k e r m a n n 1927, M a x i m o v 1929, I l j i n 1935) die Resistenz steigern, ist hier zu erinnern. All dies erscheint die Vorstellung zu stützen, daß die Zunahme des osmotischen Wertes, im besonderen Zuckeranreicherung, geradezu eine Ursache der Resistenzzunahme wäre. Ohne auf die Theorie der Frostresistenz näher einzugehen, sei hier bloß angedeutet, daß man hiebei an eine besondere Schutzwirkung der Zucker auf die Plasmakolloide dachte, wie sie seit G o r k e (1906) verschiedentlich angenommen wurde (M u d r a 1933, F u c h s 1935), oder man sah mit M a x i m o v (1912, 1914) den springenden Punkt etwa darin, daß Zucker und andere Komponenten, ohne den Gefrierpunkt der Lösung wesentlich herabzusetzen, zufolge ihres tiefen eutektischen Punktes das Wasser erst bei

niederen Temperaturen völlig ausfrieren lassen und so Plasmaschädigungen hintanzuhalten vermögen, worauf u. a. Ullrich (1942) neuerlich hingewiesen hat.

Da zeigte aber Keßler (1935) u. a., daß Erhöhung des osmotischen Wertes durch Glyzerininfiltration die Resistenz des Blattes von *Saxifraga cordifolia* keineswegs steigert, während sie umgekehrt infolge von Chloroformnarkose stark sinkt, obwohl letztere Behandlung auf den osmotischen Wert fast gar keinen Einfluß hat. Die beiden Eigenschaften können sich also unabhängig voneinander ändern, worauf vielleicht schon gewisse Unstimmigkeiten ihres Kurvenverlaufes hinweisen, die man bei genauerem Vergleich gewahrt. Auch Ulmer, der das Narkoseergebnis bestätigte, bemerkte im einzelnen solche Unstimmigkeiten. Vor allem fiel ihm auf, daß die mit unschädlichem Austrocknen verbundene passive Zunahme des osmotischen Wertes und Zuckeranteiles, mochte sie unter den natürlichen Verhältnissen des Standortes eingetreten oder im Laboratoriumsversuch künstlich herbeigeführt worden sein, bei den Ericaceen-Sträuchern fast keine Änderung der Resistenz nach sich zog.

Andererseits fanden Keßler und Ruhland (1938) das Plasma im kälteresistenten Zustand ihrer Versuchspflanzen stets viskoser als im enthärteten Zustand. Stocker und Mitarbeiter (1940, 1942) haben Analoges für die Dürresistenz nachgewiesen. Da erhöhte Viskosität auf verstärkter Wasserbildung (Hydratation) des Plasmas beruht und als leicht feststellbares Anzeichen hierfür gewertet werden kann, sehen Keßler und Ruhland eben in diesem Zustand des Plasmas die primäre Ursache der Frostresistenz. Die Tatsache, daß deren Zu- und Abnahme im Wechsel der Jahreszeit von gleichsinnigen regulativen Änderungen der Gesamt- und der Zuckerkonzentration des Saftes begleitet werden (Pisek, Sohm und Cartellieri 1935, Ulmer 1937), spricht schließlich ja auch hierfür. Doch meinte schon Ulmer, dies schließe nicht aus, daß innerhalb gewisser, von Art zu Art verschieden weit gesteckter Grenzen ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Resistenz und der Zellsaftbeschaffenheit bestehe. Auch Steiner (1939) hält die Annahme von der Rolle des Zellsaftes bei der Frostabhärtung nicht endgültig widerlegt. Er meint, man könnte sich vorstellen, daß normalerweise die regulatorische Erhöhung der Saftkonzentration genügt, um die Zellen in frostharten Zustand zu bringen, daß sie aber nicht ausreiche, wenn durch besondere Maßnahmen (z. B. Narkose) die spezifische Resistenz des Plasmas herabgesetzt wurde.

Im folgenden soll über einige Beobachtungen und Ergebnisse berichtet werden, die geeignet sind, zur Klärung dieser Frage beizutragen.

In Fortsetzung der Ulmerschen Arbeit hatten wir in den letzten Kriegsjahren in umfangreichen Versuchen den Einfluß erhöhter und erniedrigter Temperatur auf die jeweilige Frosthärte von Zweigen der Nadelhölzer und Zwergsträucher an der alpinen Waldgrenze untersucht (Pisek und Schießl, 1947). Hierbei wurde außer der Frosthärte regelmäßig der Wassergehalt und häufig auch der osmotische Wert des Preßsaftes der Blätter (kryoskopisch) unmittelbar vor und nach der Behandlung bestimmt. Auf den osmotischen Wert sind wir in der erwähnten Veröffentlichung noch

nicht eingegangen, obwohl uns schon während der Arbeit aufgefallen war, daß er sich bei *Rhododendron ferrugineum* immer sehr deutlich und gleichsinnig mit der Frosthärte änderte, während bei den Koniferen die Ausschläge meist gering waren und die Harmonie sehr zu wünschen übrig ließ.

Die Blätter von *Rhododendron* reagierten im Spätsommer und Herbst und dann wieder im Frühjahr auf mäßige, unschädliche Frosttemperaturen, die jedesmal einige Tage einwirkten, regelmäßig mit erheblicher Zunahme der Resistenz und des osmotischen Wertes (Tab. 1). Die nur geringfügigen Unterschiede zwischen dem Wassergehalt vor und nach der Behandlung weisen ebenso wie die Tatsache, daß die Produkte osmotischer Wert \times Wassergehalt nachher stets höher liegen, auf ausgesprochen regulative Zunahme der Saftkonzentration, wie das nach aller bisherigen Erfahrung zu erwarten stand. Doch ist zu bemerken, daß die Steigerung des osmotischen Wertes im Abhärtungsversuch mehrmals über das natürliche Wintermaximum hinausgeht, während die gleichzeitige Resistenzzunahme im Versuch sehr viel bescheidener ausfällt (vgl. besonders Mai!) und weit hinter dem Höchstwert der Jahresamplitude zurückbleibt. M. a. W.: Der sehr erheblichen Ausschüttung osmotisch wirksamer Substanz im kurzdauernden Kälteversuch entspricht eine mindestens absolut recht mäßige Abhärtung, während dieselbe oder sogar geringere Hinaufregulation des osmotischen Wertes, wenn sie während des Herbstes unter den natürlichen Standortverhältnissen vor sich geht, von bedeutender Resistenzsteigerung begleitet ist. Dieselbe quantitative Unstimmigkeit tritt im hochwinterlichen Verwöhnungsversuch zutage, indem (reziprok zum besprochenen Verhalten) mit geringem Rückgang der Konzentration starke Enthärtung verbunden erscheint.

Zirbe und Fichte benahmen sich im Winter und Frühjahr ähnlich wie die Alpenrose. In den sommerlichen Abhärtungsversuchen jedoch fiel bei ihnen auf, daß die osmotischen Werte nur wenig und unregelmäßig geändert, bald gehoben, bald gesenkt waren, wofür in Tab. 1 bloß zwei von mehreren Einzelversuchen angeführt sind. Nun kennzeichnet die beiden Koniferen genau umgekehrt wie *Rhododendron* eine sehr große Jahresamplitude der Frosthärte bei relativ geringer Jahresschwankung im osmotischen Wert — starke und bezeichnende interspezifische Unterschiede, die schon Ulmer herausgestellt hat. Was er in betreff der jahreszeitlichen Änderungen des osmotischen Wertes fand, gilt, wie wir hier sehen, auch vom kurzfristigen Versuch: *Rhododendron* reagiert mit heftigem Ausschlag, Zirbe und Fichte mit schwachem. So mag es bei den letzteren gelegentlich wohl geschehen, daß der Ausschlag in individuellen Unterschieden der Proben untergeht, vor denen man selbst bei sorgfältiger Auswahl möglichst homogenen Materials nicht immer ganz sicher ist. Allein das Ergebnis war auch dann nicht besser, als wir zur Vermeidung solcher Fehlerquellen den osmotischen Wert vor und nach der Kältung durch Entnahme alternierender Längsreihen von Nadeln derselben Triebe bestimmten. Danach kann man sich schwer des Eindruckes erwehren, daß bei den geprüften Koniferen, ungeachtet der auch hier feststellbaren jahreszeitlichen Koinzidenz von Abhärtung und Zunahme der Saftkonzentration, die beiden Eigenschaften doch ziemlich unabhängig voneinander sich ändern können.

Tabelle I.

	31. VIII. 1942			23. IX. 1942			16. XI. 1942			11. I. 1943			22. III. 1943			3. V. 1943									
	Fröshärte	osm. Wert	Wassergehalt	O × W	Fröshärte	osm. Wert	Wassergehalt	O × W	Fröshärte	osm. Wert	Wassergehalt	O × W	Fröshärte	osm. Wert	Wassergehalt	O × W	Fröshärte	osm. Wert	Wassergehalt	O × W					
<i>Rhododendron ferrugineum</i>	letztjährig	5½	18,2	109	192	7	18,6	101	188	18	21,4	117	250	24	21,6	112	242	15	21,9	104	228	14	17,9	101	181
	vorjährig		16,2	105	170		18,7	108	204	10	20,4	126	257	13	18,5	120	222	—	21,6	107	231	12	18,6	100	186
	letztjährig	11	22,9	103	236	12½	24,5	101	248	24	23,8	114	271					17	22,4	108	242	13	23,1	108	249
	vorjährig		19,5	100	195		22,9	100	229	12	19,7	123	242												
	letztjährig									10	16,4	115	189	10	19,1	121	231	9	19,0	109	207				
	vorjährig									17,8	123	219		7	17,7	120	212								
<i>Pinus cembra</i>	letztjährig	10	18,6	144	268	15	19,7	127	250	35	21,4	130	278	40	20,7	130	269		20,3	124	257	13	23,5	100	235
	vorjährig	12	20,1	130	261		19,2	119	229	37	22,4	121	271		22,2	128	284	30	21,3	123	262	14	22,0	96	211
	letztjährig	15	21,2	134	291	26	18,8	128	241													17	27,0	110	297
	vorjährig	16	20,9	118	247		19,6	122	239														26,2	104	273
	letztjährig									27	17,9	135	242	26	18,9	130	246		19,4	125	243				
	vorjährig									28	18,5	129	239	25	20,2	129	261	23	20,9	121	253				

Um das Bild zu vertiefen und zu vervollständigen, wurden in den Jahren 1945—1947 weitere derartige Versuche mit demselben Material (von der Baumgrenze auf der Nordseite des Patscherkofels, 1900 m) unternommen. Ich erfreute mich hierbei der ausgezeichneten Mithilfe von Prof. V. Iljin, der über mein Ersuchen die kryoskopierten Preßsäfte auf Zucker, Stärke und einige der wichtigsten An- und Kationen analysierte, wofür ihm auch hier herzlich gedankt sei.

Methodisches

Über den Vorgang bei der Frosthärtebestimmung erwähne ich unter Hinweis auf die einschlägige Darstellung bei Ulmer (1937) sowie bei Pisek und Schießl (1947) kurz nur folgendes: mit grobem Filtrierpapier ausgelegte, sturwandige Glasgefäße wurden mit je einigen Trieben der zu prüfenden Pflanze beschickt und mit Thermometer versehen in Kältegemische oder — wenn es sich um besonders tiefe Temperaturen handelte — in Alkoholbäder getaucht, die in Dewargefäße eingefüllt waren. In den Bädern liefen Kühlschlangen, durch welche nach Bedarf flüssige Luft gepumpt wurde. Die Temperatur in den Kammern wurde allmählich bis auf einen bestimmten, von Kammer zu Kammer verschiedenen Tiefpunkt gesenkt und dieser dann mindestens 2 Stunden gehalten, worauf man die Temperatur wieder langsam steigen ließ. Nach Überschreitung des Nullpunktes kamen die Proben heraus und blieben zusammen mit unbehandelten Kontrollen in Wasser eingestellt so lange im diffusen Licht in einem kühlen Raum (10—12°), bis sich allfällige Schäden sicher beurteilen ließen. Das war im Sommer schon nach 1—2 Tagen, im Winter erst nach frühestens 2—3 Wochen möglich. Zeigte es sich nun z. B., daß Proben, die sich im Gefäß mit der Tiefsttemperatur — 14° befunden hatten, wenigstens zu 10% geschädigt waren und solche aus Kammern mit — 15°, — 17° usw. gleiche oder größere Schäden aufwiesen, während bei Tiefsttemperaturen von über — 13° alles gesund blieb, so wurde als Frosthärte der betreffenden Pflanze zum gegebenen Zeitpunkt — 14° verzeichnet.

Den osmotischen Wert haben wir nach Walter (1931) mit dem Mikrokryoskop von Burian-Drucker am Preßsaft der Nadeln, bzw. Blätter bestimmt und korrigiert (Walter 1936), den Wassergehalt in der üblichen Weise als Differenz zwischen Frisch- und Trockengewicht ermittelt und in Prozenten des Trockengewichtes berechnet. Die quantitativen Bestimmungen der mengenmäßig wichtigsten Lösungskomponenten des Preßsaftes und der Stärke hat Prof. Iljin nach den von ihm für solche Analysen erprobten und geübten Verfahren vorgenommen, die in seinem im Druck befindlichen Praktikum der Pflanzenanalyse beschrieben sind, worauf in betreff aller Einzelheiten verwiesen und hier nur erwähnt sei, daß der Zuckergehalt nach einer etwas abgeänderten Bertrandmethode bestimmt und nach den Tabellen bei Walter (1936) in Atmosphären umgerechnet wurde.

Ergebnisse

A. Osmotischer Wert, Zuckerspiegel, Stärkegehalt und Frosthärte

I. *Rhododendron ferrugineum* (Abb. 1)

1. Jahresgang von osmotischem Wert, Zuckerspiegel, Stärkegehalt und Frosthärte.

Die Alpenrose zeichnet sich durch ständig relativ hohen Gesamtzuckerspiegel aus. Als wir Mitte August 1945 die Arbeit begannen, enthielten die

heurigen Blätter, die damals schon ziemlich ausgereift waren, 80 mg/cm³ Saft. Im folgenden Winter stieg die Menge auf maximal 104, im Winter 1946/47 sogar auf 174 mg. Auch die beiden anderen Versuchsarten wiesen im zweiten Winter höheren Zuckergehalt auf — allerdings nur rund 25% mehr als im vorausgegangenen. Die Ursache dieses somit allgemein zutreffenden, bei der Alpenrose nur besonders auffälligen Befundes, der sich auf heurige wie vorjährige Blätter erstreckt, ist völlig dunkel. Im Sommer überwiegt eher die nichtreduzierende, im Winter mehr die reduzierende Komponente (Maximum 56, bzw. 94 mg). Die ausgeprägte Jahresperiode des Zuckerpartialdruckes beruht fast ausschließlich auf Zu- und Abnahme dieser reduzierenden Komponente, die auch die Schwankungen des gesamten osmotischen Wertes (14 bis 22, bzw. 25 at) ausschließlich bestimmt.¹ Da der Wassergehalt vom Spätsommer zum Spätwinter gleich blieb und im Frühsommer vorübergehend mit der Saftkonzentration zurückging, handelt es sich im vorliegenden Falle bei den jahreszeitlichen Schwankungen der Saftkonzentration nicht bloß vorwiegend, sondern ausschließlich um regulative Vermehrung (Herbst) und Verminderung (Frühjahr) osmotisch wirksamer Substanzen. Unter diesen bestreiten die Zucker ständig 40—50% des osmotischen Wertes, im Maximum des Winters 1946/47 sogar 75%, was sich durchaus in den Rahmen des bisher Bekannten fügt (Steiner 1935, Ulmer 1937).

Reziprok zum Jahrgang der beiden besprochenen Größen läuft die Kurve des Stärkegehaltes. Mit bescheidenen Vorräten von 40—60 mg je Gramm Trockengewicht gehen die Blätter in den Winter, währenddessen die Menge weiter schwindet (Minimum um 20 mg). Aber schon von Ende März ab sammelt sich offenbar im Zusammenhang mit dem Wiedererwachen der Lebenstätigkeit, besonders der Assimilation, sowie infolge Verschiebung des Stärke-Zucker-Gleichgewichtes wieder mehr Stärke an; besonders reichlich fand sie sich zur Zeit des beginnenden Bergsommers (1. Juni 1946: 126 mg je Gramm Trockengewicht), worauf ihre Menge mit Einsetzen des Triebes, d. h. mit dem Kohlehydratverbrauch bei der Ausbildung des Membrangerüsts der jungen Stengel und Blätter wieder abnimmt.

Aus Abb. 1 ist ohneweiters ersichtlich, daß die Jahresperiode der Frosthärte jener des osmotischen Wertes und Zuckerspiegels im wesentlichen parallel läuft. Im Sommer — die Zeit, da die neugebildeten Blätter noch unreif waren, blieb außer Betracht — vertrugen die Pflanzen — 5 bis — 6° ohne größeren Schaden. In den beiden Wintern hielten sie bis — 18° aus, obwohl sie im zweiten viel ausgiebiger aktiv Zucker angereichert hatten als im vorausgegangenen und die gefundene Resistenz nach unseren früheren Erfahrungen kaum das absolut mögliche Maximum bedeuten konnte.

2. Änderungen der drei Größen im Abhärtungs- und Enthärtungsversuch.

Wurden während der warmen Jahreszeit frisch eingebrachte Zweige für einige Tage in unschädlichem, schwachem Frost von wenigen Graden unter

¹ So auch bei *Hedera* und *Ilex* (nach Steiner 1933 und Pittius 1935).

Null gehalten (wir gingen nicht unter -4° herab), dann schwoll der Gehalt der Blätter an reduzierenden Zuckern regelmäßig um mehr als die Hälfte

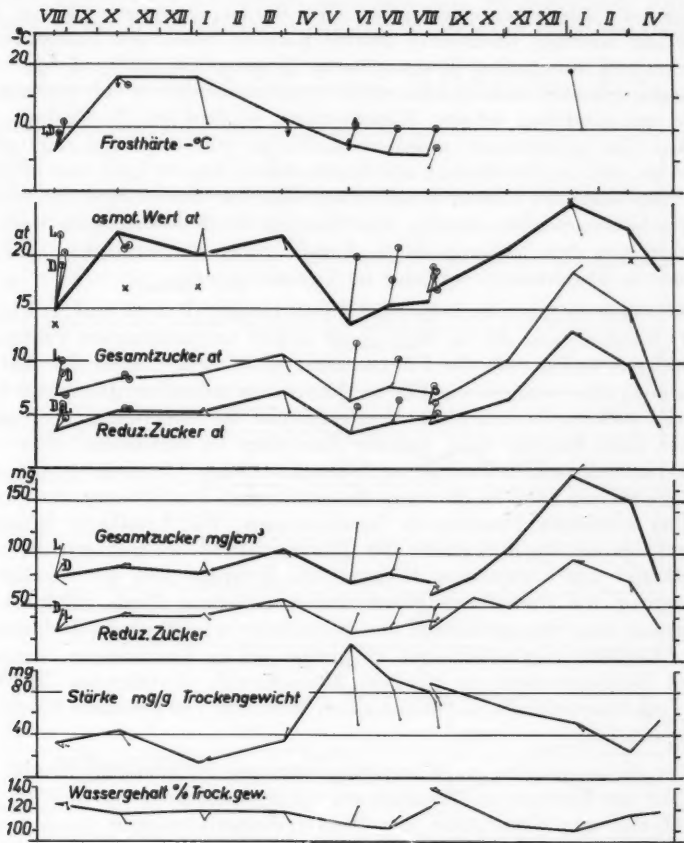


Abb. 1. *Rhododendron ferrugineum*, letztjährige Blätter. Frosthärte, osmotischer Wert, Zucker-, Stärke- und Wassergehalt im Jahrgang 1945–1947 und deren Änderungen in Abhärtungs- (beringte Punkte) und Enthärtungsversuchen (kleine, angehängte Punkte). x = Summe der Partialdrücke der Zucker + analysierter Elektrolyte. Mit 16. August 1946 beginnen die Kurven des neuen Jahrganges der Blätter. Abhärtung bei 0 bis -4° , Enthärtung (nur im Winter) bei $16-18^{\circ}$.

der ursprünglichen Menge an, gleichgültig, ob das Kälten im Licht oder im Dunkeln vorgenommen wurde (August 1945 L, bzw. D). Bloß die inzwischen einjährig gewordenen Blätter im Augustversuch 1947 taten in diesem Punkte nicht mit. Der nichtreduzierende Zuckeranteil konnte dabei eben-

falls zunehmen (Juni 1946!), ungefähr gleichbleiben oder auch geringfügig zurückgehen. Letzteres fanden wir mehrmals, wenn wir die Kältung im Dunkeln probeweise auf 6—8 Tage verlängert hatten, weshalb wir es in der Regel bei 4 Tagen bewenden ließen. Wie das im einzelnen auch war, jede derartige Kältung verursachte scharfe positive Stöße des Zuckerpartialdruckes und osmotischen Wertes. Da der Wassergehalt während der Frostversuche sich nicht änderte oder selber zunahm, handelt es sich hierbei nicht etwa um Eindicken infolge Wasserverlust, sondern um Neubildung von Zucker. Der gleichzeitige, ungemein auffällige Stärkeschwund zeigt schlagend an, daß die Neubildung auf Kosten dieser Reserve geht und offenbar auf einer durch die niedere Temperatur bedingten Verschiebung des Zucker-Stärke-Gleichgewichtes beruht. Anreicherung durch Assimilation war, abgesehen von dem Lichtversuch (L August 1945), ausgeschlossen, weil die Proben in Blechbüchsen verwahrt im Eisraum standen.

Wie nach eingehenden früheren Untersuchungen (Pisek und Schießl, 1947) feststand und die im Zuge dieser Arbeit vorgenommenen Prüfungen bestätigten, nahm auch die Frostresistenz unter dem Einfluß des Kältes stets mehr oder weniger zu. Die im Jahresgang gefundene Harmonie fehlt so weit auch im Versuch nicht. Vergleicht man die Änderungen aber quantitativ, dann bemerkt man, daß die Ausschläge im osmotischen Wert und Zuckerpartialdruck, besonders im frühsummerlichen Härtungsversuch, sehr heftig sind und nahe an die unter den natürlichen Verhältnissen im Winter 1945/46 erreichten Höchstwerte herankommen; die Frosthärte hingegen nimmt nur um einen Bruchteil der Jahresamplitude zu und erreicht nicht annähernd den winterlichen Höchststand. Während also der regulativen Steigerung von Zuckerpartialdruck und osmotischem Wert, wenn sie im Übergang vom Sommerzustand zur Winterruhe erfolgt, große Änderungen der Frosthärte zugeordnet sind, entspricht der im kurzfristigen, sommerlichen Härtungsversuch in gleichem Ausmaße sich einstellenden Zunahme von Zuckerpartialdruck und osmotischem Wert eine viel geringere Resistenz-erhöhung.

Umgekehrt ergaben im Winter vorgenommene Enthärtungsversuche, bei welchen die Proben vom Standort weg in Temperaturen von 15—18° verbracht und zur Vermeidung von Wassergehaltsänderungen unter weiten Glasstürzen gehalten wurden, daß die Frosthärte schon im Jänner in Übereinstimmung mit unseren früheren Erfahrungen stark nachließ (von —18 auf —10°), während die anderen beiden Größen gleichzeitig nur unerheblich zurückgingen.

Die vorjährigen Blätter wiesen nicht nur im Sommer, solange die jungen noch in Entwicklung waren, sondern bis ins Frühjahr meist geringfügig höheren osmotischen Wert auf als die letztjährigen; ihr Zucker und Wassergehalt hielt sich fast in den gleichen Grenzen und war nur bedeutend und nicht charakteristisch von jenem des jüngsten Jahrganges verschieden. Im übrigen reagierten sie eher schwächer als dieser, aber grundsätzlich ebensowohl und bestätigten somit die oben angeführten Ergebnisse, so daß sich eine besondere Darstellung erübrigt.

II. *Pinus Cembra* und *Picea excelsa* (Abb. 2 und 3)

Die Zirbe, bei der sich wieder die an den beiden letzten Nadeljahrgängen getrennt gewonnenen Ergebnisse, abgesehen von unbedeutenden Abweichungen in der Resistenz, fast völlig decken, wies bei ungefähr gleichen

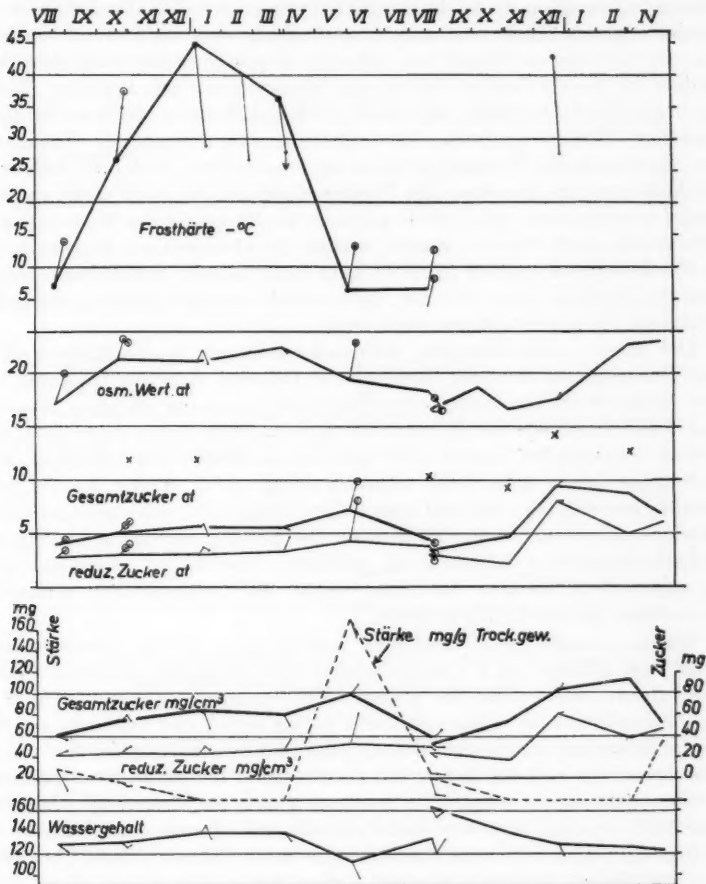


Abb. 2. *Pinus cembra*, letztjährige Nadeln. Erläuterung vgl. Abb. 1.

winterlichen Beträgen einen wesentlich ausgeglicheneren Jahresgang des osmotischen Wertes auf als die Alpenrose (Amplitude 17–22, bzw. 23 at, gegenüber 14–22, bzw. 25 at). Auch die Schwankung im Zuckergehalt, an dem mengenmäßig der nichtreduzierende Anteil häufig überwiegt, ist schwach. Die Kurve des Zuckerpartialdruckes verläuft im Gegensatz zu

den Verhältnissen bei *Rhododendron* nicht immer sympat, geschweige parallel zu jener des osmotischen Wertes, an dem die Zucker im Falle der Zirbe mit zumeist nur 23–30% beteiligt sind (Maximum 55%, Dezember 1946).

Zwischen weiten Grenzen pendelt der Stärkegehalt. Im Winter lassen sich in den Nadeln der Zirbe merkwürdigerweise nur Spuren davon nachweisen. Aber schon Ende April (1947!) war — wie bei *Rhododendron* — wieder reichlich Stärke vorhanden; im Frühsommer, am 1. Juni, bestimmten wir die enorme Menge von 160 mg/g Trockengewicht, nach dem Austreiben im August fanden sich in den überwinterten wie heurigen Nadeln nur mehr rund 20–30 mg. Der hohe Stärkegehalt am 1. Juni macht die in derselben Bestimmungsreihe hervortretende, vorübergehende Depression des Wassergehaltes wenigstens teilweise verständlich. Bedeutet doch diese Stärkemenge eine Zunahme des Trockengewichtes, die nicht mehr vernachlässigt werden kann und (*ceteris paribus*) als Rückgang des Wassergehaltes aufscheinen muß. Aus den Zahlen, welche die gleichzeitigen Bestimmungen an *Rhododendron* ergaben (Abb. 1), kann man dasselbe herauslesen, freilich weniger deutlich, weil dort die Unterschiede zwischen den aufeinanderfolgenden Terminen weniger stark sind.

Der relativ unbedeutenden Jahresschwankung von osmotischem Wert und Zuckerspiegel steht die durch unsere früheren Arbeiten bekannte und hier wieder bestätigte, außerordentlich große Spannung zwischen Sommer- und Winterfrosthärte der Zirbe an der alpinen Waldgrenze gegenüber. Ihre Nadeln vertrugen im August nicht mehr als die Blätter der Alpenrose, d. h. bloß einige Grade unter Null, während sie im tiefen Winter bei der Resistenzbestimmung bis — 40° und noch tiefere Temperatur ohne nennenswerten Schaden aushielten. Solcher Kälte kann der Baum innerhalb seines alpinen Verbreitungsgebietes höchstens in größeren Frostlöchern ausgesetzt sein. An exponierten Hängen sind ihm Sturm und Schneegebläse vermutlich gefährlicher als starke Kälte allein.

Wurden Zweige unter denselben Bedingungen wie bei *Rhododendron* einige Tage gekältet (oder warm gehalten), dann nahm ihre Resistenz absolut stets beträchtlich zu (oder ab), wogegen die Änderung im osmotischen Wert und Zuckerspiegel im allgemeinen sehr gering ausfiel und vielleicht aus diesem Grunde nicht immer gleichsinnig jener der Frosthärte gefunden wurde. Eine Ausnahme von der Regel, daß entsprechend der schwachen Spannung zwischen den jahreszeitlichen Extremwerten auch im Versuch die Reaktion hinsichtlich osmotischem Wert und Zuckerspiegel schwach ausfiel, macht der kräftige Sprung des Monosaccharidgehaltes beim Kälten Anfang Juni 1946. Die Vermehrung der reduzierenden Zucker ging teilweise auf Kosten der zur Zeit in großer Menge angehäuften Stärke, teilweise auf Kosten des nicht reduzierenden Anteils, die beide während der Behandlung abgenommen hatten. Im osmotischen Wert wurde ein ganz entsprechender Stoß bemerkbar. Das Ergebnis stimmt bestens mit jenem der Alpenrose zusammen, von der wir vorhin erwähnten, daß die im gleichen Härteversuch mit ausgiebigster Zuckerausschüttung reagierte. Allerdings verloren die Zirbelzweige in diesem Versuch — sonst waren die Schwankungen stets unbedeutend — so viel Wasser, daß ein Teil der Erhöhung des Zuckerpartialdruckes

darauf zurückgeführt werden muß. Aber es bleiben doch ungefähr 2 at aktiver Zunahme (gerade soviel wie die Hinaufregulation zum Winter ausmachte), denen keine auch nur annähernd angemessene Resistenzsteigerung entspricht. Umgekehrt war im Oktoberversuch bei weit geringerer Zuckerrücknahme der Abhärtungserfolg viel bedeutender als im Juni. So ergeben sich auch bei der Zirbe je nach Jahreszeit quantitative Unstimmigkeiten zwischen den in Beziehung gebrachten Größen, soweit sie sich im Versuch überhaupt gleichsinnig änderten.

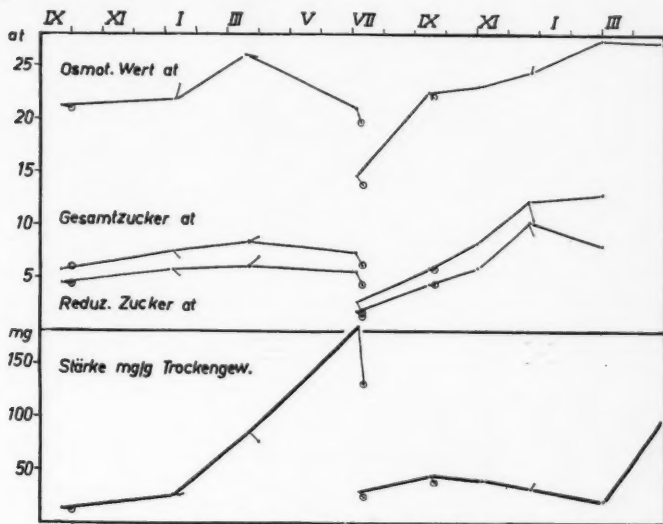


Abb. 3. *Picea excelsa*, letztjährige Nadeln. Osmotischer Wert, Zuckerpartialdruck und Stärkegehalt. Erläuterung wie Abb. 1.

Picea ließ bei aller grundsätzlichen Übereinstimmung zwischen dem Jahresgang der Resistenz einerseits, der Gesamt- und Zuckerkonzentration andererseits hinsichtlich des Ergebnisses von erhöhter und erniedrigter Temperatur jeden klaren Zusammenhang zwischen diesen Eigenschaften vermissen. Doch ist hierzu zu bemerken, daß bei der Fichte nicht bloß osmotischer Wert und Zuckerspiegel in allen Versuchen wenig beeinflusst wurden; auch die Resistenz änderte sich in den Abhärtungsversuchen nur wenig. Sie nahm nur um 1–2° zu. Aufenthalt in Zimmertemperatur allerdings hatte im Jänner auch hier zur Folge, daß sie stark zurückging (von –38 auf –25°).

Im übrigen fand sich bei der Fichte in Übereinstimmung mit Ulmer absolut und relativ etwas größerer Zuckergehalt als bei der Zirbe, wobei die Monosaccharide ständig schon der Menge nach überwiegen und daher den Großteil des Zuckerpartialdruckes und seiner jahreszeitlichen An-

derung wie auch der Jahresschwankungen des osmotischen Wertes bestreiten. Stärke führen die Nadeln im Winter rund 10–20 mg je Gramm Trockengewicht. Im Spätwinter und Frühjahr wird sie wie bei den anderen Arten sehr stark vermehrt (Maximum: überwinterte Nadeln 4. Juli 184 mg).

B. Sonstige Zellsaftkomponenten (Abb. 4–6)

Außer den Zuckern wurden als weitere, wichtige Lösungsbestandteile des Zellsaftes die Anionen Apfel- und Zitronensäure sowie die Kationen K, Ca und Mg regelmäßig bestimmt. In früheren Jahren von Iljin (1932, 1934, 1936, 1938, 1940, 1944) an mehreren Hundert Pflanzen verschiedener Stand-

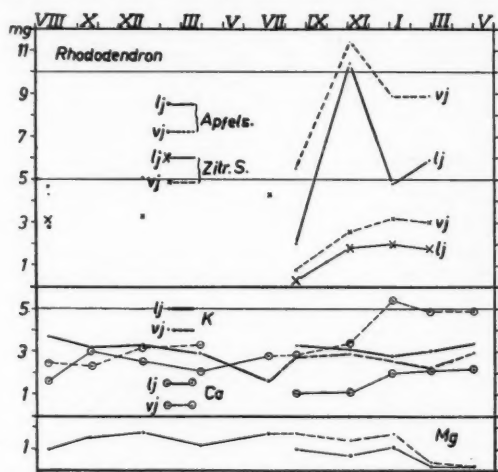


Abb. 4. Gehalt des Pflanzensaftes letztjähriger (lj) und vorjähriger (vj) Blätter von *Rhododendron ferrugineum* an Apfel- und Zitronensäure, Kalium, Calcium und Magnesium (mg/cm^3 Saft).

orte durchgeführte Analysen hatten gezeigt, daß dies die verbreitetsten und mengenmäßig im allgemeinen die wichtigsten Komponenten sind. Im zweiten Jahr der Untersuchung wurde überdies der Gehalt an gelöstem N stichprobenweise geprüft.

Über das Ergebnis dieser Bestimmungen am unbehandelten Frischmaterial (Basispunkte der Kurven Abb. 1–3) läßt sich im allgemeinen sagen, daß 1. alle drei Pflanzen ständig mehr Apfel- als Zitronensäure führen; 2. die letztjährigen Blätter weniger Säure und auch weniger Ca und Mg enthalten als die vorjährigen, dafür aber etwas K-reicher sind als diese, was besonders bei der ersten Bestimmung nach dem Austreiben des neuen Jahrganges im August 1945 an Zirbe und Fichte auffällt (über K-Reichtum der jungen Blätter vgl. Iljin, 1944); 3. der Gehalt an jeder der geprüften Komponenten von Jahr zu Jahr mitunter erheblich schwanken kann. So führten die vorjährigen Blätter von *Rhododendron* im zweiten Winter

wesentlich mehr Ca und im Zusammenhang hiemit auch mehr Apfel-, aber weniger Zitronensäure als im vorausgegangenen. *Pinus* enthielt im August 1945 mehr K als zur selben Zeit im folgenden Jahre.

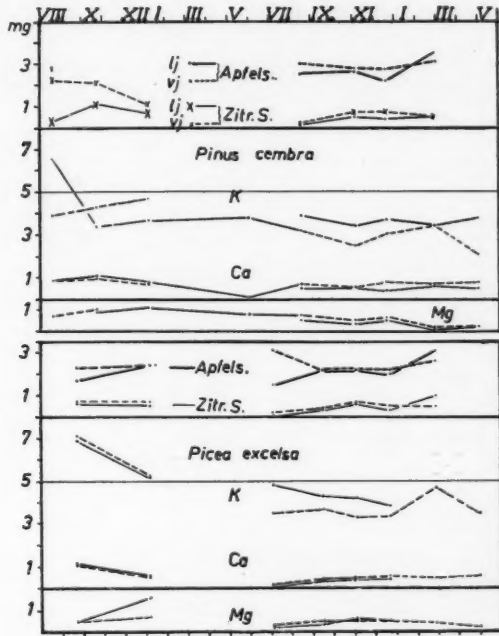


Abb. 5. *Pinus cembra* und *Picea excelsa*, Gehalt des Preßsaftes letztjähriger (lj) und vorjähriger (vj) Nadeln an einigen wichtigen An- und Kationen (mg/cm³ Saft).

Der K-Gehalt von *Rhododendron* hält sich zwischen rund 2 und 3,5 mg je Kubikzentimeter Preßsaft. *Pinus cembra* schwankt fast in den gleichen Grenzen, nur der Wert vom August 1945 (6,5 mg) ist ebenso wie der entsprechende Wert von *Picea* (7 mg) stark überhöht. *Picea* stellt im übrigen mit seinen 3,5 bis 5 mg/cm³ die K-reichste der drei Arten vor. Beide Koniferen sind durch sehr geringen Gehalt an gelöstem Ca und Mg ausgezeichnet, der hinsichtlich jedes dieser Kationen 1 mg nie überstieg, während die Alpenrose immerhin meist 1–2 mg Mg und 2–3 mg Ca (in den vorjährigen, im zweiten Winter bis 5 mg!) führte und wohl im Zusammenhange mit dem größeren Gehalt an zweiwertigen Kationen (Iljin 1938), besonders an Ca, auch wesentlich größere Säuremengen enthält. Die Koniferen weisen höchstens 2 mg Zitronensäure und 4 mg Apfelsäure auf; die Alpenrose 2–3 mg der ersteren und bis 9 mg Apfelsäure. Der Analysenwert von 11 mg im November 1946 scheint uns fehlerhaft überhöht.

Hinsichtlich jahreszeitlicher Änderungen kann man bei *Rhododendron* eine gewisse Ca- und Mg-Anreicherung und Hand in Hand damit auch größere Säuremengen im zweiten Winter feststellen; bei den Koniferen sind die Änderungen völlig belanglos. So ist es denn durchaus verständlich, daß die nach dem Kälten, bzw. Warmhalten durchgeführten Saftanalysen

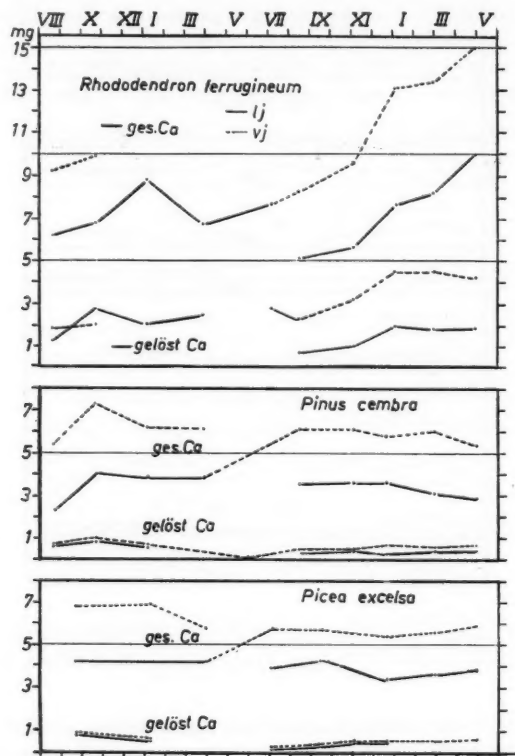


Abb. 6. Gesamte Ca-Menge der Blätter und Gehalt an gelöstem Ca in Milligramm je Gramm Trockengewicht.

keinen geordneten Einfluß der Behandlung auf den Gehalt an den einzelnen Ionen erkennen lassen, vielmehr innerhalb einer gewissen Streuung in der Regel die Grundbestimmung bestätigen.

War schon die Menge des gelösten Ca in den vorjährigen Blättern größer als in den letztjährigen, so gilt dies erst recht vom gesamten Ca-Gehalt. Er stieg bei *Rhododendron* nicht nur im Sommer, sondern auch während des Winters und erreichte Ende April 1947 den Höchstbetrag von 10, bzw. 15 mg/g Trockengewicht, wogegen er bei den Koniferen ziemlich konstant

blieb und über 4, bzw. 6–7 mg nicht hinausging. Es ist für alle drei Arten, besonders die Koniferen, sehr bezeichnend, daß das gelöste Ca nur einen kleinen Bruchteil der Gesamtmenge ausmacht (Abb. 6 — da der Wassergehalt stets etwas mehr als 100% des Trockengewichtes beträgt, werden die Zahlen je Kubikzentimeter Saft durch die Umrechnung auf Gramm Trockengewicht ausgedrückt). Die weitaus überwiegende Ca-Menge ist also als Niederschlag vorhanden. Dies zusammen mit dem absolut geringem Gehalt an gelöstem Ca und an den beiden analysierten Säuren stempelt alle drei hier untersuchten Arten, besonders die Nadelhölzer, zu „physiologisch Calciophoben“ im Sinne Iljins (1932, 1940), was dem ökologischen Charakter von *Rhododendron ferrugineum* und *Pinus Cembra* durchaus entspricht. Sind sie doch beide Bewohner kalkarmer, saurer Böden, die über Ca-Karbonatgestein nur dort siedeln, wo entsprechend dicke Humus-Isolierschichten entwickelt sind. Wie weit die bodenvage Fichte auch auf kalkreicherem Substrat sich calciophob oder anpassungsfähig verhält, wurde im Zuge der vorliegenden Untersuchung nicht geprüft.

Im Vergleich zu den Analysenergebnissen von mehr als 200 verschiedenen krautigen Pflanzen, die Iljin 1932 veröffentlichte, unter denen kaum $\frac{1}{10}$ mehr als 20 mg/cm³ Mono- und nur etwa $\frac{1}{10}$ mehr als 10 mg Disaccharide enthielten, sind unsere drei Arten, wie wohl alle wintergrünen (Pittius 1934, Steiner 1933, Ulmer 1937), relativ zuckerreich. Selbst *Pinus Cembra*, die davon am wenigsten enthält, führt mindestens 40 mg Mono- und 10 mg Disaccharide. Die Menge der übrigen hier bestimmten Saftkomponenten nimmt sich dagegen bescheiden aus, und es erhebt sich die Frage, welchen Anteil des gesamten osmotischen Wertes sie bestreiten.

Mit Rücksicht auf die schwer abschätzbaren Fehlerquellen, die der Berechnung dieses Anteiles der Elektrolyte aus der verschiedenen Kombinationsmöglichkeit der verschiedenwertigen Ionen und aus den unübersichtlichen Dissoziationsverhältnissen erwachsen, habe ich ihren Partialdruck empirisch wenigstens ungefähr zu ermitteln versucht, indem ich für einige Basispunkte der Kurven des osmotischen Wertes (Abb. 1 und 2) entsprechend den Analysenangaben Lösungen hergestellt und kryoskopiert habe. Die Einwaagen der Apfel- und Zitronensäure waren den Analysentabellen unmittelbar zu entnehmen, jene der Kationen wurden über deren Normalität auf die Hydroxydverbindung berechnet. Die Differenz zwischen der Gesamtnormalität der bestimmten Kationen und jener der analysierten beiden Anionen wurde durch 1n HCl ersetzt.

Die so ermittelten und auf Gefrierpunkttemperatur korrigierten Partialdrucke hielten sich bei *Rhododendron* zwischen rund 5 (Februar 1947) und 8 at (Jänner 1946), bei *Pinus* zu denselben Zeitpunkten zwischen 4 und 6 at als Extremwerten. Die Schwankungen sind also verhältnismäßig gering, wie das auch Pittius (1934) bei *Hedera* und *Ilex* gefunden hatte. Bei *Rhododendron* decken die Zucker und die analysierten Elektrolyte zusammen 80–100% des jeweiligen osmotischen Wertes (Kreuzchen in Abb. 1 und 2!), so daß hier tatsächlich die Hauptmenge der osmotisch wirksamen Substanzen erfaßt erscheint. Im fraglichen Rest mag unbekannte freie Säure stecken, nach Pittius würde man in erster Linie an Phosphor- und Schwe-

felsäure denken. Gelöster Stickstoff wurde bei allen drei Arten in Stichproben während des zweiten Winters nur sehr wenig, höchstens $1\frac{1}{2}$ mg/cm³ gefunden; er kann schon aus diesem Grunde keine nennenswerte Rolle spielen (Tab. 2). Bei *Pinus* hingegen macht der Partialdruck sämtlicher bestimmten Komponenten bestenfalls 65% des gesamten osmotischen Wertes aus — nur im Dezember 1946 betrug er 80%, doch dürfte diesmal der osmotische Wert vermutlich zu niedrig sein. Bei *Pinus* sind unserer Analyse

Tab. 2. N gelöst, mg/cm³ Saft.

		August	November	Dezember	Jänner
<i>Rhododendron</i> . .	letztjährig	1,26	0,92	—	0,56
	vorjährig	1,26	0,90	—	0,56
<i>Pinus Cembra</i> . . .	letztjährig	1,62	1,23	0,88	—
	vorjährig	1,00	0,81	0,88	—
<i>Picea excelsa</i> . . .	letztjährig	1,43	1,00	0,45	—
	vorjährig	1,11	1,67	0,45	—

sonach mengenmäßig wichtige Substanzen entgangen, was weiterer Aufklärung bedarf. Gerbstoffe sind nach Pittius (1934) und Walter und Steiner (1936) osmotisch unwirksam und auch alle bei 100° flüchtigen (ätherischen) Stoffe des Preßsaftes der Fichte vermochten, durch Wasser geleitet, dessen Gefrierpunkt nicht zu verändern (Knodel 1938). Derartige Stoffe kommen für die Aufklärung des Fehlbetrages hiemit nicht in Betracht.

Zusammenfassung

Es wurden die im natürlichen Wechsel der Jahreszeiten und die im Kurzversuch unter der Einwirkung tiefer, bzw. hoher Temperatur vor sich gehenden Änderungen der Kälteresistenz der Blätter einerseits, anderseits jene des osmotischen Wertes und Zuckerspiegels des Preßsaftes sowie dessen Gehalt an einigen anderweitigen, mengenmäßig wichtigen Komponenten (K, Ca, Mg, Apfel- und Zitronensäure), außerdem der Stärke- und Wassergehalt bestimmt. Zum Vergleich mit dem osmotischen Wert wurden die den jeweils gefundenen Zuckermengen entsprechenden Partialdrucke aus den von Walter (1936) mitgeteilten Tabellen durch graphische Interpolation, der Partialdruck der Ionensummen stichprobenweise empirisch ermittelt. Sämtliche analysierten Komponenten zusammen decken bei *Rhododendron* mindestens $\frac{1}{3}$ des gesamten osmotischen Wertes, während dieser bei *Pinus Cembra* zu $\frac{1}{4}$ bis fast $\frac{1}{2}$ von Substanzen bestritten werden muß, die unsere Analyse nicht erfaßten.

Der Ionengehalt schwankt, abgesehen von der auffälligen Ca- und Säureanreicherung bei *Rhododendron* im zweiten Winter, im Jahresgang relativ wenig, jedenfalls weniger als der Zuckerspiegel. Dementsprechend ergaben die Enthärtungs- und Härtungsversuche keinen wesentlichen und eindeutigen Einfluß auf den Gehalt an den einzelnen Ionen. *Pinus* und *Picea* änderten bei derartiger Behandlung auch ihren relativ niederen Zuckerspiegel und den osmotischen Wert im allgemeinen wenig und nicht

immer gleichsinnig mit der Resistenz, wie sie auch im Jahresgang in der Gesamt- und in der Zuckerkonzentration eine geringe Spannung zwischen Höchst- und Mindestwert aufweisen. *Rhododendron* hingegen reagierte entsprechend der ihm eigenen größeren Jahresamplitude des osmotischen Wertes und Zuckerspiegels mindestens im Abhärtungsversuch mit mehr oder weniger kräftigen und in allen Versuchen mit der Resistenzänderung gleichsinnigen Ausschlägen. Bedeutendere Zuckeranreicherung geht dabei auf Kosten der Stärke, deren die Blätter aller drei Arten im Winter wenig oder nur Spuren (*Pinus*!), im Spätwinter und Frühsommer große Mengen führen.

Hinge die Frosthärte ursächlich unmittelbar vom osmotischen Wert und Zuckergehalt ab, wäre zu erwarten, daß bei einer bestimmten Pflanze einer bestimmten Änderung der letzteren Größen — wenigstens soweit sie aktiver Natur und nicht bloß durch Wasserschwankungen bedingt sind — stets dieselbe Änderung der Frosthärte entspräche. Dies trifft nicht zu. Vor allem ist die aktive Zunahme des osmotischen Wertes und Zuckerspiegels in den frühsommerlichen Abhärtungsversuchen mit *Rhododendron* und *Pinus*, obwohl sie fast das Maximum des vorausgegangenen Winters erreichte, von nur bescheidener Steigerung der Resistenz begleitet, die selbst bei *Rhododendron* nicht annähernd zum winterlichen Höchstwert führte. Umgekehrt konnte bei *Pinus* im Herbst sprunghafte Resistenzzunahme bei nur geringer Zuckerausschüttung erzielt werden. Der Grund kann nur darin zu suchen sein, daß die Pflanzen im Herbst sich im Übergang zur Winterruhe befanden, im Frühsommer dagegen bereits hochaktiv waren und eben dieser verschiedene Zustand, d. h. die augenblickliche Phase der inneren Periodizität für die Resistenz in erster Linie ausschlaggebend, die Zuckeranreicherung hingegen eine mehr sekundäre, eine Begleiterscheinung ist. Was ihren Zeigerwert nicht zu schmälern und einen — allerdings beschränkten — unmittelbaren Zusammenhang zwischen Resistenz und Zuckergehalt nicht auszuschließen braucht.

Literatur

- Akermann, A., 1924, Beiträge zu einer Analyse der Eigenschaft Winterfestigkeit an Weizen. Beitr. landw. Pflanzenbau, Schindler-Festschrift 147.
 — 1927, Studien über den Kältetod und über die Kälteresistenz. Lund.
 Asai, T., 1932 und 1937, Untersuchungen über die Bedeutung des Mannits im Stoffwechsel einiger höherer Pflanzen I u. II. Jap. Journ. of Bot. VI, VIII.
 Christoff, M. A., 1939, Über die Kältefestigkeit der Wintergerste. Zeitschrift f. Pflanzenzüchtg. 23.
 Fuchs, W. H., 1930, Weiteres zur Bestimmung der Kälteresistenz des Winterweizens durch indirekte Methoden. Wiss. Arch. Landw. A 3.
 — 1935, Die Veränderung der Struktur und Reaktion der Zelle bei Abkühlung. Kühn-Arch. 39.
 Geffken, K., 1934, Zur Bestimmungsmethodik biologisch wichtiger Kohlehydrate in Pflanzenmaterial. Bot. Arch. 36.
 Gorka, 1906, Über chemische Vorgänge beim Erfrieren der Pflanzen. Landwirt. Versuchstationen (zitiert Lidfors).
 Iljin, W. S., 1932, Zusammensetzung der Salze in der Pflanze auf verschiedenen Standorten. Kalkpflanzen. B. B. C. 50, I.

- 1935, The Relation of Cell Sap Concentration to cold Resistance in Plants. Bull. Ass. Russ. Recherches scientif. Prague III.
- 1936, Zur Physiologie der kalkfeindlichen Pflanzen. B. B. C. 54 A.
- 1940, Boden und Pflanze II, Physiologie und Biochemie der Kalk- und Kiesel-pflanzen. Abh. Russ. Forschges. Prag 10 (15).
- 1944, Salze und organische Säuren der Kalkpflanzen. Flora 37 (137).
- Kleines Praktikum der Pflanzenanalyse (im Druck).
- Keffler, W., 1935, Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Planta 24.
- und W. Ruhland, 1938, Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta 28.
- Knodel, H., 1938, Eine Methodik zur Bestimmung der stofflichen Grundlagen des osmotischen Wertes von Pflanzensäften. Planta 28.
- Maximov, M. A., 1912, Chemische Schutzmittel der Pflanzen gegen das Erfrieren. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 30.
- 1914, Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. wiss. Bot. 53.
- 1929, Internal Factors of Frost and drought resistance in Plants. Protoplasma 7.
- Lidforss, B., 1907, Die wintergrüne Flora. Lund.
- Mudra, A., 1933, Zur Physiologie der Kälteresistenz des Winterweizens. Planta 18.
- Pisek, A. und Schiefl, 1947, Die Temperaturbeeinflussbarkeit der Frosthärte von Nadelhölzern und Zwergsträuchern an der alpinen Waldgrenze. Ber. Naturw.-med. Verein Innsbruck 47.
- Pittius, G., 1934, Über die stofflichen Grundlagen des osmotischen Druckes bei *Hedera helix* und *Ilex Aquifolium*. Bot. Arch. 37.
- Steiner M., 1933, Zum Chemismus der osmotischen Jahresschwankungen einiger immergrüner Holzgewächse. Jahrb. wiss. Bot. 78.
- 1939, Die Zusammensetzung des Zellsaftes bei höheren Pflanzen in ihrer ökologischen Bedeutung. Ergebn. Biolog. 17.
- Stocker, O., 1942, Untersuchungen über die physiologischen Grundlagen der Dürresistenz landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Forschungsdienst, Sonderheft 16.
- 1947, Probleme der pflanzlichen Dürresistenz. Naturw. 34.
- Schmidt, H., K. Diwald und O. Stocker, 1940 Plasmatische Untersuchungen an dürr empfindlichen und dürreresistenten Sorten landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Planta 31.
- Ullrich, H., 1943, Biologische Kältewirkungen und plasmatische Frostresistenz. Protoplasma 38.
- Ulmer, W., 1937, Über den Jahresgang der Frosthärte einiger immergrüner Arten der alpinen Stufe sowie der Zirbe und Fichte. Jahrb. wiss. Bot. 84.
- Walter, H., 1931, Die Hydratur der Pflanzen und ihre physiologisch-ökologische Bedeutung. Jena: Fischer.
- 1931, Die kryoskopische Bestimmung des osmotischen Wertes bei Pflanzen. Handb. Biolog. Arbeitsmethoden XI/4.
- 1936, Tabellen zur Berechnung des osmotischen Wertes von Pflanzenpreß-Säften, Zuckerlösungen und einigen Salzlösungen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 54.

Zur cH-Abhängigkeit der Wasserpermeabilität des Protoplasmas

Von

Felix Seemann

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 9 Textabbildungen

(Eingelangt am 18. Juni 1949)

1. Einleitung

In einer noch wenig bekannten Arbeit untersuchten L. u. M. Brauner (1943) den Einfluß der cH auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. In hypertonischen Lösungen von Kaliumnitrat oder Zucker, die mit Puffern verschiedener pH-Bereiche (pH 3,5 bis pH 7,9) versehen wurden, prüften die Autoren mit Zellen der Innenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* und der Stengelepidermis von *Phlomis tuberosa* die Wirkung der cH auf die Wasserpermeabilität. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die sich aus der planimetrischen Berechnung der Plasmolysegrade P^0 ($P^0 = 100$ mal Zellfläche : Protoplastenfläche), der Messung der Plasmolysegeschwindigkeit sowie der Konvexplasmolysezeit zusammensetzen, zeigen, daß die Geschwindigkeit der Protoplastenkontraktion im Bereiche pH 5,3 am größten ist, während das Haftvermögen des Plasmas an der Zellwand, die Viskosität des Protoplasten und der Diffusionswiderstand des Wassers im gleichen Bereiche (pH 5,3) die kleinsten Werte aufweisen. Die folgenden Abbildungen (Abb. 1, 2) aus der Arbeit von L. u. M. Brauner (1943) zeigen die geschilderten Beeinflussungen in sehr guter Weise.

Die Permeation gelöster Stoffe und ihre Abhängigkeit von der cH untersuchte Iljin (1928) für Zucker und Salze, Rottenburg (1943) für Harnstoff und Glycerin. Nach Iljin sinkt die Permeabilität vom sauren zum neutralen Bereiche und steigt wieder im alkalischen Bereiche an. Dabei liegt der Tiefpunkt der untersuchten Stoffe auf verschiedener Höhe, für Zucker bei pH 7, für Kalium bei pH 5,6.

Nach dem Permeabilitätsverhalten in Glycerin und Harnstoff konnte Rottenburg (1943) in den von ihr untersuchten Zellsorten drei Gruppen aufstellen. Bei den geprüften Zellen von *Tradescantia elongata*, *Majanthemum bifolium*, *Muscari racemosum*, *Taraxacum officinale* und *Lamium purpureum* nimmt die Permeabilität von der sauren nach der alkalischen Seite zu, während bei *Campanula trachelium* und *Gentiana austriaca* die Harnstoffpermeabilität vom Neutralpunkt nach der alkalischen Seite deutlich abnimmt. In *Zygnema* sp. aber fand Rottenburg ein Objekt,

das eine gesetzmäßige cH-Abhängigkeit der Permeabilitätsgrößen nicht erkennen ließ.

Im folgenden soll die Abhängigkeit der Wasserpermeabilität von der cH mit einer messenden Methode nachgeprüft und untersucht werden, ob der Einfluß der cH mit den zur Verfügung stehenden Mitteln mit Sicherheit nachweisbar ist.

2. Methodik und Material

Ich arbeitete mit der plasmometrischen Methode nach Höfler (Höfler 1918 a, b; 1930; 1931; Huber-Höfler 1930), einer alten, in vielen Versuchen bewährten Meßmethode, deren sich unter anderen de Haan (1933), Huber (1933), Levitt-Scarath-Gibbs (1936), Hofmeister (1939), Frey-Wyssling und v. Rechenberg-Ernst (1943), Frey-Wyssling (1946) und Bochsler (1948) bei ihren Arbeiten über die Wasserpermeabilität des Protoplasmas bedienten.

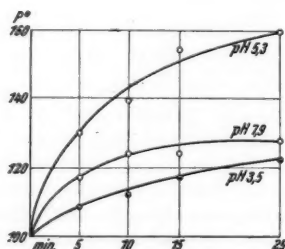


Abb. 1

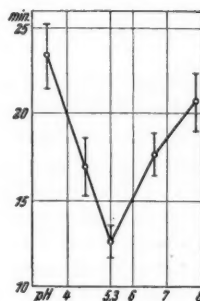


Abb. 2

Abb. 1. Graphischer Verlauf der Protoplastenkontraktion in drei verschiedenen pH-Bereichen.

Allium cepa; 0,6 mol KNO₃, $\frac{1}{10}$ -McIlvain-Puffer (L. u. M. Brauner, 1943, S. 298).

Abb. 2. Durchschnittswerte aus einer Reihe von Versuchen zur Bestimmung der Konvexpasmolysezeit in verschiedenen pH-Bereichen.

Allium cepa; 0,6 mol KNO₃, $\frac{1}{10}$ -McIlvain-Puffer (L. u. M. Brauner, 1943, S. 296).

Die Messung des Plasmolyseverlaufes erfolgt nach den Regeln der Plasmometrie (vgl. Höfler [1918 a, b]), die aus dem Verhältnis des Protoplastenvolumens V_P zum Zellvolumen V_Z den Plasmolysegrad G als Maßzahl berechnen lassen. Zellen mit kreiszylindrischen Querschnitt und konvexe, an den Seitenwänden anliegende Protoplasten sind Voraussetzung zu genauen Messungen.

$$G = \frac{V_P}{V_Z} = \frac{l - \frac{b}{3}}{h}$$

$$G = \frac{l + l' - \frac{2b}{3}}{h}$$

(bei geteilten Protoplasten)

l = Länge des Protoplasten

h = Innenlänge der Zelle

b = Innenbreite der Zelle

l, l' = Länge der Teilprotoplasten

Handelt es sich um die Berechnung der Wasserpermeabilität, so sind für die Auswertung eines Versuches zumindest drei Messungen notwendig, von denen zwei den Beginn (g_1 und g_2) und eine, nach Erreichung des Gleichgewichtes, den Endgrad G der Plasmolyse erfassen müssen.

Zur Berechnung der Wasserpermeabilität verwendete ich die von Höfler (1930) entworfene mathematische Auswertung der Plasmolysekurven, die von der Annahme ausgeht, daß sich das Volumen des Protoplasten proportional dem osmotischen Gefälle, das von der Außenlösung zum Zellsaft besteht, verkleinere. In einer Formel ausgedrückt ergibt dies: $\frac{dg}{dt} = -k(C - c)$; g ist der jeweilige Plasmolysegrad, C ist die Konzentration des Plasmolytikums, c ist die veränderliche Konzentration des Zellsaftes und k ist ein Proportionalitätsfaktor. Das Vorzeichen Minus bedeutet, daß das Protoplastenvolumen und die Plasmolysegrade während der Kontraktion in Abnahme begriffen sind. Wird der in den Versuchen bestimmte Plasmolysegrad g als unabhängig Veränderliche verwendet und weiterhin mit y bezeichnet, so sieht die Formel nach Substituierung von $c = O/y$ (aus der Beziehung $O = c_1 y_1 = c_2 y_2 = CG$) folgendermaßen aus:

$$\frac{dy}{dt} = -k \left(C - \frac{O}{y} \right)$$

Durch diese Differentialgleichung ist, wie Höfler (1930) annimmt, das Momentangesetz gegeben, das den Vorgang des Plasmolyseeeintrittes beherrscht. Vgl. auch Jacobs (1927) und Jacobs-Steward (1932). Durch Integration der Gleichung

$$\frac{dt}{dy} = -\frac{1}{k} \left(\frac{y}{Cy - O} \right) \dots t = -\frac{1}{k} \int \frac{y}{Cy - O} dy \text{ erhalten wir schließlich die}$$

$$\text{Formel } t = \frac{1}{Ck} \left(1 - y + \frac{O}{C} \ln \frac{1 - O:C}{y - O:C} \right). \text{ Da aber } O:C \text{ dem Endwert } G \text{ der}$$

Plasmolyse entspricht, so lautet die Formel zur Berechnung der Eintrittskonstanten

$$\text{endgültig: } k_E = \frac{1}{C(t_2 - t_1)} \left\{ (y_1 - y_2) + G \cdot \ln \frac{y_1 - G}{y_2 - G} \right\}$$

Den Proportionalitätsfaktor k , der die Geschwindigkeit des Plasmolyseablaufes angibt, bezeichnet Höfler als Eintrittskonstante k_E (bei der Deplasmolyse-Rückgangskonstante k_R). Die Konstante k ist ein Kurvenabschnitt der Plasmolysekurve zwischen zwei Meßpunkten (g_1, g_2) und gibt uns die relative Volumänderung in der Zeiteinheit (Minute) bei der Einheit des Konzentrationsgefälles (Grammol) an. Werte von k , die mit verschiedenen Diosmotika gewonnen wurden, müssen, um vergleichbar zu sein, auf die isotonische Konzentration umgerechnet werden. Für die Deplasmolyse wird der Wert von k_R nach folgender Formel berechnet:

$$k_R = \frac{1}{C'(t_2 - t_1)} \left\{ -(y_2 - y_1) + G' \cdot \ln \frac{G' - y_1}{G' - y_2} \right\}$$

Erklärung der Zeichen:

C = Konzentration des Diosmotikums bei der Plasmolyse (Plasmolytikum)

C' = Konzentration des Deplasmolytikums

t_1, t_2 = Meßzeiten von y_1 und y_2 (= Plasmolysegrade g_1, g_2)

G = Endgrad der Plasmolyse nach Erreichung des Gleichgewichtes

G' = Endgrad der Plasmolyse im Deplasmolytikum

\ln = log nat.; log. nat. $x = 2,3026 \log. x$.

Die Berechnung der Eintritts- und Rückgangskonstanten scheint sehr zeitraubend, ist aber bei einiger Übung für einen Wert in drei bis fünf Minuten möglich (mit Rechenschieber und Logarithmentafel).

Ein Beispiel soll zeigen, wie die Berechnung eines k_R -Wertes erfolgt: *Salvinia natans*, Versuch II, 17, Zelle 3, Plasmolyse in 0,25 GM KNO_3 .

$g_1 = 0,817$ wurde in der 4. Minute des Versuches gemessen.

$g_2 = 0,708$ wurde in der 6. Minute des Versuches gemessen.

$G = 0,362$

$$y_1 - y_2 = 0,817 - 0,708 = 0,109$$

$$\ln \frac{y_1 - G}{y_2 - G} = \ln \frac{0,455}{0,346} = \ln 1,315$$

$$\ln 1,315 = 2,3026 \log 1,315$$

$$\log 1,315 = 0,11893$$

$$k_E = \frac{1}{C(t_2 - t_1)} \left\{ y_1 - y_2 + G \cdot \ln \frac{y_1 - G}{y_2 - G} \right\}$$

$$k_E = \frac{1}{0,25 \cdot 2} (0,109 + 0,099)$$

$$k_E = \frac{0,208}{0,50} \quad \begin{array}{r} 0,362 \dots 0,55871 - 1 \\ 0,1189 \dots 0,07518 - 1 \end{array}$$

$$k_E = 0,416 \quad \begin{array}{r} 2,3026 \dots 0,36220 \\ 0,99609 - 2 \end{array}$$

$$G \cdot \ln \frac{y_1 - G}{y_2 - G} = 0,099$$

Die Berechnung von k_R erfolgt in der gleichen Art. Bei der Deplasmolyse wendete ich die Methode der partiellen Deplasmolyse an, d. h. die Zellen wurden nicht in Wasser, sondern in einer verdünnten Lösung des Plasmolytikums deplasmolysiert. Bei einer Deplasmolyse in Wasser würde das ganze Gefälle der Außenkonzentration C zur Wirkung kommen und das Plasma schädigen, während bei der Plasmolyse nur das Gefälle $C - O$ (O = osmotischer Zellwert) seinen Einfluß ausübt, wie Lepeschkin (1910) nachgewiesen hat. Am günstigsten ist der Deplasmolyseverlauf, wenn die Deplasmolyse in einer Lösung vorgenommen wird, die dem osmotischen Grundwert der Zellen entspricht oder nahekommt. Ich wandte die Deplasmolyse nur in jenen Fällen an (*Cladophora*, *Spirogyra* H, N und *Valisneria*), wo der Eintritt der Plasmolyse konkav und krampfartig erfolgte.

Eine andere Methode zur Berechnung der Wasserpermeationskonstante stammt von Bochsler (1948) und geht von der Annahme aus, daß die Wasserpermeation nach dem Fickschen Diffusionsgesetz verläuft. Diese Methode, die ebenfalls die plasmometrische Messung der plasmolysierten Protoplasten benutzt, hat große Vorzüge. Die Berechnung der Permeationskonstante ist unabhängig von der Konzentration des Plasmolytikums, und es genügt die Messung des Plasmolyse-Endgrades G sowie eines Plasmolysegrades g zur Zeit t . Die Frage der mathematischen Behandlung stand aber bei Bochsler sehr stark im Vordergrund, und seine Berechnungsweise ist physiologisch doch noch wenig erprobt.

Die Lösungen stellte ich volummolar her. Die Diosmotika wurden im Meßkölbchen abgewogen und dann das Lösungsmittel bis zur Meßmarke aufgefüllt. Als Lösungsmittel gebrauchte ich Standort-, Leitungs- und bidestilliertes Wasser (das zweitemal über Jenaglas destilliert). Die Arbeitslösungen bereitete ich täglich frisch aus den Stammlösungen.

Zum Puffern der Lösungen benutzte ich die üblichen Phosphatpuffer von Sørensen (1909) (vgl. Strügger 1938) oder Zitratpuffer nach McIlvain (vgl. Clark 1928, Welcher 1947; S. 64), die auch Brauner (1943) verwendete.

Die Herstellung und Zusammensetzung der Puffer und der gepufferten Lösungen: Das bidestillierte Wasser für die Lösungen wurde ausgekocht, um die

Kohlensäure zu verdrängen und dann in luftdicht abgeschlossenen Gefäßen bis zum Gebrauche aufbewahrt.

Der Phosphatpuffer besteht aus $\frac{1}{15}$ mol primäres Kaliumphosphat, $\frac{1}{15}$ mol sekundäres Natriumphosphat, $\frac{1}{15}$ mol tertiäres Natriumphosphat und für stark saure Bereiche noch $\frac{1}{10}$ n Salzsäure. Die Pufferreihe wird durch Mischung der einzelnen Komponenten in verschiedenen Mengen zusammengesetzt.

pH-Bereich	ccm prim. K-Phosphat	ccm sek. Na-Phosphat	ccm tert. Na-Phosphat	n/10/HCl ccm
3,1	9,0	—	—	1,0
4,3	9,95	—	—	0,05
4,8	10,0	—	—	—
6,0	9,0	1,0	—	—
7,0	4,0	6,0	—	—
8,0	0,25	9,75	—	—
8,7	4,5	—	5,5	—
10,1	4,0	—	6,0	—

Der Zitratpuffer setzt sich aus Stammlösungen von 0,2 mol sek. Natriumphosphat und 0,10 mol Zitronensäure zusammen, die, nach vorgeschriebenen Verhältnis gemischt, eine pH-Reihe von pH 2,2 bis 8,0 ergeben. Dieser Puffer kann mit Vorteil auch in Elektrolytlösungen (mit Ausnahme von Ca) angewendet werden.

Die von mir verwendeten pH-Bereiche setzen sich beim Zitratpuffer wie folgt zusammen:

pH-Bereich	ccm 0,2 mol sek. Na-Phosph.	ccm 0,1 mol Zitronensäure
3,0	4,11	15,89
4,0	7,7	12,3
4,8	9,86	10,14
5,2	10,72	9,28
5,6	11,6	8,4
6,0	12,63	7,37
6,4	13,85	6,15
6,8	15,45	4,55
7,0	16,47	3,53
7,2	17,39	2,61
8,0	19,45	0,55

Von diesen fertigen Pufferlösungen eines bestimmten pH-Bereiches wurde immer 1 Teil auf 9 Teile der Lösung gegeben. Die derartig hergestellten Pufferlösungen enthalten $\frac{1}{150}$ mol Salz.

Gegen die Verwendung der Zitronensäure kann der Einwand erhoben werden, daß die Wasserpermeabilität durch die Permeation der Säure stärker beeinflusst wird als durch den Einfluß der Wasserstoffionen. Die Maximalkonzentration der Zitronensäure beträgt bei pH 3 $\frac{3}{1000}$ GM und ist in den höheren Bereichen noch bedeutend kleiner. Brenner (1918) hat das Permeationsverhalten der Zitronensäure untersucht und stellt fest, daß die undissoziierten Moleküle bzw. Anionen der Zitronensäure keinen schädlichen Einfluß auf das Plasma ausüben.

Zur Herstellung der Lösungen verwendete ich Meßpipetten mit $\frac{1}{10}$ und $\frac{1}{100}$ cm³ Genauigkeit. Die Temperatur betrug bei den meisten Versuchen 18 bis 20° C. Alle Messungen wurden bei künstlichem Licht ausgeführt. Ein Reichert-Mikroskop neuester Bauart stand mir dabei zur Verfügung. Okular 6x mit Okularmikrometer (100 Strich), Objektiv 60:1, A = 0,75. Die Werte von h , l , b sind in Strichen des Okularmikrometers angegeben. 1 Strich ist 2,7 μ .

Das Pflanzenmaterial (*Spirogyra*, *Cladophora*) holte ich jeden zweiten Tag frisch aus dem Wasserpark in Floridsdorf (Wien XXI) vom gleichen Standort, *Vallisneria* und *Salvinia* aus dem Glashaus des Institutes, wo sie in Aquarien, bzw. in einem Betonbecken kultiviert werden. Die Schnitte wurden vor den Versuchen entlüftet, bei den Algen und den Wasserblättern der *Salvinia* erübrigte sich dies.

Die Behandlung der Pflanzenteile während der Messung: Die Wasserblätter, die Algen und die Schnitte wurden unter dem Deckglas beobachtet. Der Objektträger war mit einem Paraffinstreifen versehen, auf dem das Deckglas ruht und somit keinen Druck auf die darunter befindlichen Pflanzenteile ausüben kann. Gleichzeitig wird der mit der Lösung erfüllte Raum vergrößert. Das Diosmotikum wurde, wenn nicht gerade gemessen wurde, dauernd mittels Filterpapierstreifen durchgesaugt, bzw. mit einem Glasstab zugesetzt. Bei dieser Durchsaugemethode ist streng darauf zu achten, daß keine Reste des Plasmolytikums auf dem Objektträger bleiben, eintrocknen und beim neuerlichen Durchsaugen unter das Deckglas kommen. Der Vorteil dieser Durchsaugemethode ist klar, denn die Pflanzenteile bleiben während des ganzen Versuches unberührt unter dem Deckglas, und die Zellen sind immer leicht zu finden. Vergleichende Versuche mit Schnitten, die nach jeder Messung wieder in das Fläschchen mit der Lösung kamen, zeigten keine Unterschiede gegenüber den mit der Durchsaugemethode gewonnenen Ergebnissen. Bei Algenfäden und den Wasserblättern käme eine solche zeitweilige Übertragung in ein Fläschchen überhaupt nicht in Frage, da bei den Wasserblättern die Zellen kaum mehr wiederzufinden wären und die Algenfäden beim Herausnehmen vertrocknen würden.

Die Algenfäden, wie auch die Schnitte, wurden mit Glassplitterchen am Objektträger fixiert, um ein Verrutschen oder Wegschwemmen während des Durchsaugens zu verhindern. Bei den Wasserblättern von *Salvinia* war dies nicht erforderlich.

3. Versuche mit *Salvinia natans*

Dieser Wasserfarn lieferte mit den Zellen seiner Wasserblätter das beste Objekt für meine Versuche. Zellen von *Salvinia* wurden zuerst von Huber für Messungen der Wasserpermeabilität herangezogen (vgl. Huber-Höfler, 1930, S. 411—418, 438—447, 482—489, 505), doch hat er mit *S. auriculata* gearbeitet. Die Luftblätter von *Salvinia natans* sind annähernd doppelt so lang wie breit und nicht gestielt. Die Blätter stehen in dreizähligen Wirteln. Jeder Wirtel besteht aus zwei ungeteilten Luftblättern und einem vielteiligen Wasserblatt, das sich aus neun bis zwölf Teilen zusammensetzt. Die an diesen Wasserblatteilen befindlichen Zellfäden wurden zur Messung verwendet. Jeder Zellfaden wird von einer Reihe einfacher Zellen gebildet, die zur Spitze hin allmählich schmaler werden. Die Endzelle ist zugespitzt, braun gefärbt und für Messungen nicht zu gebrauchen.

In allen Versuchen nahm ich die Wasserblätter des jüngsten Wirtels, dessen Luftblätter schon geöffnet auf der Wasseroberfläche liegen. Zellen

von älteren Wirteln sind aus folgenden Gründen nicht zu verwenden:

1. Die Zellen werden zu lang, dadurch kommt es bei der Plasmolyse meist zu Teilungen der Protoplasten. Bei meinen Versuchen war es aber wichtig, eine möglichst große Anzahl von Zellen zu messen, was sich mit den langen Zellen und den geteilten Protoplasten aus Zeitgründen nicht empfiehlt.
2. Das Plasma unterliegt in den Zellen von älteren Wirteln starken Veränderungen, ja es kommt schließlich zu einer gänzlichen Auflösung des Plasmas, so daß die Haarfäden in älteren Wasserblättern nur mehr kapillare Saugorgane darstellen.

Ich fand, daß sich die Zellen der Wasserblätter von *Salvinia natans* untereinander in physiologischer Hinsicht unterscheiden. Die basale Zelle eines Zellhaares (in den Versuchen die „Zelle 1“) hat die kürzeste Rundungszeit

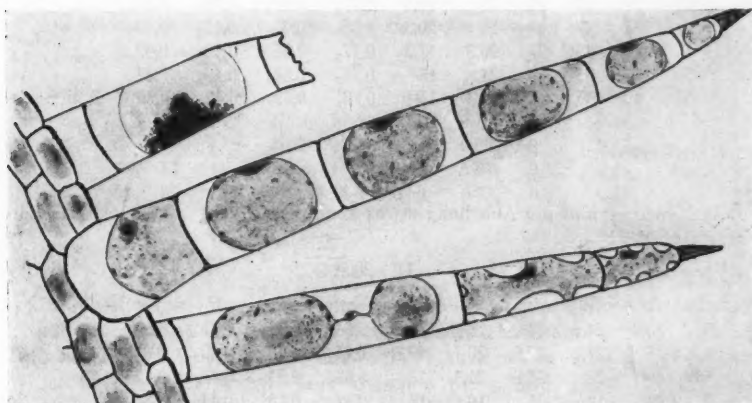


Abb. 3. *Salvinia natans*; Plasmolysierte Zellen vom Wasserblatt.

und ist gegen schädliche äußere Einflüsse am widerstandsfähigsten. Die distalen Zellen zeichnen sich durch hohe Viskosität des Plasmas und durch eine hohe Wasserpermeabilität aus. Am besten vergleichbar sind die Zellen 2 bis 5, deren Zellbau allen plasmometrischen Anforderungen entspricht.

Die bei den Versuchen mit *Salvinia* unter der Rubrik „Zelle“ befindlichen Zahlen geben die Lage der gemessenen Zelle im Zellfaden an. Wie schon oben erwähnt, ist die basale Zelle Nummer 1, die nächste 2 usw. Die Zeichen (z. B. 2', 2⁺), die den Zahlen oft angefügt sind, bedeuten, daß diese Zellen von einem anderen Zellhaar des gleichen Wasserblatteiles stammen.

Die Abb. 3 gibt den Ausschnitt eines Wasserblattes wieder. Der obere Zellfaden ist verletzt, in der Zelle befindet sich ein Tonoplast, leicht durch das koagulierte Plasma, welcher außen anhaftet, zu erkennen. Der mittlere Zellfaden zeigt das typische Bild einer guten Plasmolyse. Der Protoplast der ersten Zelle liegt in vielen Fällen mit einem Meniskus an der distalen Querwand an und wurde in dieser Stellung nicht zu Messungen verwendet. Der untere Zellfaden hat in einer langen Zelle geteilte Protoplasten, während die distalen Zellen noch konkave Plasmolyseformen aufweisen.

Salvinia natans

Versuchsbedingungen: Plasmolyse in 0,25 GM KNO_3 . Lösungsmittel ist bidestilliertes Wasser. Die CH-Reihe wurde mit McIlvain-Puffer hergestellt. Am Beginn des Versuches kamen die Wasserblätter auf zwei Minuten in das Fläschchen mit dem Plasmolytikum, dann erst auf den Objektträger unter das Deckglas.

pH 3

Die Abhebung der Protoplasten beginnt konkav, geht aber in den ersten Minuten des Versuches in sehr gut meßbare, konvexe Formen über. Fast alle Zellen sind lebend und plasmolysiert.

Versuch II./14		1. XII. 48				LT: 21° C				
Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>G</i>	<i>k</i> _E	Zeit ¹
2+	48	43	38	26	18	0,77 ₁	0,66 ₇	0,41 ₇	0,34 ₈	4—7'
3+	36	33	30	22	15,5	0,77 ₈	0,68 ₈	0,46 ₇	0,33 ₄	"
2	51	47	40	28	20,3	0,78 ₅	0,65 ₂	0,41 ₈	0,43 ₃	"
4	48	43	37	26,3	17,3	0,77 ₆	0,65	0,42 ₇	0,42 ₃	"
5	37	33	29	21	15	0,75 ₇	0,64 ₀	0,43 ₂	0,37 ₇	"
6	40	35	32	21,3	13	0,76 ₇	0,69 ₂	0,42 ₅	0,36	5—7'
									2 275 : 6	

Mittelwert von $k_E = 0,37_9$.

pH 4

Auch hier beginnt die Abhebung etwas konkav und geht bald in gut meßbare Formen über.

Versuch II./19		2. XII. 48			LT: 20,5° C					
Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
5	30	24,5	21	18	15	0,65 ₃	0,53 ₃	0,43	0,60 ₃	7—10'
4	36	27,8	23,5	20	17,5	0,61 ₁	0,48 ₀	0,39 ₅	0,60 ₂	„
5+	36	29	25,5	21,3	18	0,64 ₂	0,53 ₀	0,42 ₅	0,47	„
6+	24	19	17	16	16	0,57 ₁	0,49 ₂	0,44 ₆	0,64 ₈	„
7+	31,5	21,7	18,8	17	13,5	0,54 ₈	0,45 ₁	0,39 ₄	0,56 ₇	„
									2 890 : 5	

Mittelwert von $k_E = 0,57_8$.

pH 6

Gut konvexe Protoplastenformen ab Beginn des Versuches. Die Mehrzahl der Zellen ist plasmolysiert und lebend.

Versuch II./41			6. XII. 48		LT: 19,5° C					
Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>G</i>	<i>k_E</i>	Zeit
1	55	33	31	29,3	15,5	0,50 ₈	0,46 ₀	0,43 ₈	0,50 ₃	4—7'
2	49	31	27,8	26	14,5	0,53 ₅	0,46 ₀	0,43 ₃	0,68 ₈	"
3+	53	43	36,5	30	13,5	0,72 ₇	0,60 ₄	0,48 ₁	0,60 ₄	"
4+	43	31,5	28	25	13	0,63	0,55 ₁	0,48 ₁	0,59 ₁	"
									2 386 : 4	

Mittelwert von $k_E = 0,59_7$.

¹ LT: Lufttemperatur; h = Zelllänge; b = Zellbreite; l_1 , l_2 = Länge des Protoplasten bei den Meßzeiten t_1 und t_2 ; l = Länge des Protoplasten nach Erreichung des osmotischen Gleichgewichtes; g_1 , g_2 = Plasmolysegrade; G = Endgrad der Plasmolyse.

pH 7

Der Eintritt der Plasmolyse erfolgt sofort konvex. Alle Zellen sind plasmolysiert.

Versuch II./13 1. XII. 48 LT: 21° C

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
2	30	29	24	18	17	0,77 ₇	0,61	0,41	0,55 ₈	3—7'
3	38	34	28	20	15	0,76 ₈	0,60 ₅	0,39 ₅	0,50 ₇	"
3+	30	26	21	17	14,5	0,70 ₇	0,54 ₀	0,40 ₇	0,63 ₂	"
									1 695 : 3	

Mittelwert von $k_E = 0,56_3$.

pH 8

Am Beginn krampfartige Plasmolyse, sie dauert etwa bis zur 3. Minute.

Versuch II./17 2. XII. 48 LT: 20° C

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
3	55	52	46	27	21,3	0,81 ₇	0,70 ₈	0,36 ₂	0,41 ₈	4—6'
4	59	53	47,5	29,5	20	0,79 ₄	0,69 ₂	0,38 ₇	0,42 ₆	"
6	61	51	44	28	19	0,73 ₈	0,61 ₈	0,35 ₈	0,48 ₈	"
2+	57	52	42	27,5	18,5	0,80 ₄	0,63 ₂	0,37 ₄	0,48 ₅	"
									1 815 : 4	

Mittelwert von $k_E = 0,45_4$.

Im stark sauren und im alkalischen Bereiche beginnt die Abhebung der Protoplasten konkav, die Werte der Eintrittskonstanten sind hier am kleinsten. Der Gipfelpunkt der bei Plasmolyse in KNO_3 gefundenen Wasserpermeabilitätskurve liegt zwischen pH 4 und pH 7. In den vorliegenden Versuchen wird er im Bereiche pH 6 erreicht (Abb. 4). Die Plasmolyse wird von allen Zellen der Wasserblätter sehr gut und ohne Schaden ertragen.

Salvinia natans

Versuchsbedingungen: Plasmolyse in 0,40 GM Glycerin. Lösungsmittel ist bi-distilliertes Wasser. Das Plasmolytikum ist mit McIlvain-Puffer gepuffert. Am Beginn des Versuches kamen die Wasserblätter auf zwei Minuten in das Fläschchen mit dem Plasmolytikum.

pH 4

Versuch II./30 3. XII. 48 LT: 20° C

Kurzes, junges Wasserblatt. Sehr gute Form der Protoplasten ab Beginn. Die Mehrzahl der Zellen ist plasmolysiert.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	51	40,8	37	27	18	0,68 ₈	0,60 ₈	0,41 ₂	0,17 ₈	9—12'
4	56,5	41	36	26	13	0,65	0,56 ₄	0,38 ₈	0,20	6—9'
3+	83	58	52,5	38	18,5	0,62 ₄	0,55 ₈	0,38 ₈	0,15 ₇	"
									533 : 3	

Mittelwert von $k_E = 0,17_8$.

pH 5,6

Versuch II./26 3. XII. 48

LT: 21° C.

Die gemessenen Zellen haben gute Form, doch sind viele Tonoplasten im Wasserblatt, und bei Protoplasten treten oft zipfelige Formen auf.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>G</i>	<i>k_E</i>	Zeit
1	48	35	32,5	26,3	14	0,63 ₂	0,57 ₇	0,45	0,27 ₂	5-7'
1+	66	49	43	27	17,5	0,65 ₂	0,56 ₄	0,32 ₂	0,23 ₂	"
1'	63	49	45	31	17	0,68 ₂	0,62 ₃	0,40 ₂	0,21 ₂	"
									723 : 3	

Mittelwert nur *k_E* = 0,24₁.

pH 7

Versuch II./32 3. XII. 48

LT: 17° C

Die gemessenen Zellen haben ab Beginn des Versuches sehr gute Form. Viele Tonoplasten und tote Zellen im Wasserblatt.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>G</i>	<i>k_E</i>	Zeit
2	62	47	41	26,8	15	0,67 ₂	0,58 ₁	0,35 ₁	0,18 ₁	6-9'
3	65	44	37,5	27	14	0,60 ₂	0,50 ₂	0,34 ₂	0,22 ₂	"
5	67	24-	22-	17,8	12	0,54 ₇	0,48	0,36 ₇	0,19 ₂	"
Tpr. 20,5 18,5 14,8									604 : 3	

Mittelwert von *k_E* = 0,20₁.

Die Zelle 5 hat geteilte Protoplasten (Tpr.).

pH 8

Versuch II./35 4. XII. 48

LT: 17° C

Die Plasmolyse beginnt krampfartig und geht dann langsam in sehr gute Formen über. Zahlreiche Tonoplasten vorhanden.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁	<i>g</i> ₂	<i>G</i>	<i>k_E</i>	Zeit
2	50	36	32	24	15	0,62 ₄	0,54	0,38	0,19 ₂	7-10'
4	32	24	21	15	13	0,61 ₂	0,51 ₂	0,34 ₁	0,21 ₂	"
2+	32	23	21	16	14	0,57 ₂	0,51	0,35	0,14 ₇	"
									557 : 3	

Mittelwert von *k_E* = 0,18₂.

Die Ergebnisse in den einzelnen pH-Bereichen sind von der gleichen Art, wie die mit Kaliumnitrat durchgeführten. Der Gipfelpunkt der bei der Plasmolyse in Glycerin gefundenen Kurve der Eintrittskonstanten liegt um den Bereiche pH 5,6. Zum sauren und zum alkalischen Bereiche sinken die Werte von *k_E* wieder ab (Abb. 5).

4. Versuche mit *Vallisneria spiralis*

Flächenschnitte aus der mittleren Region des Blattes eignen sich am besten zu den Messungen, da hier das Blatt am dicksten ist und die Zell-

längen den Anforderungen der Meßmethode gut entsprechen. Bei sämtlichen Versuchen nahm ich die Blätter von einer Pflanze. Alle Messungen wurden während der Deplasmolyse durchgeführt. Gemessen habe ich in erster Linie die Mesophyllzellen, daneben aber auch Epidermiszellen, die im Prinzip das gleiche Verhalten zeigen. Die Streuungen der Einzelwerte sind jedoch bei den Epidermiszellen sehr groß, was natürlich den Wert dieser Messungen stark herabsetzt. Bei vergleichenden Messungen der Wasserpermeabilität von Epidermis- und Mesophyllzellen des *Vallisneriablatte*s fand Huber (1953), daß der Plasmolyse Eintritt (KNO_3 , NaCl als Plasmolytikum) in den Mesophyllzellen 30 bis 40mal langsamer erfolgt als in den Epidermiszellen. Die Unterschiede beruhen nach dem Autor zum geringeren Teile auf verschiedenen Zellgrößen der beiden Gewebe, zum größeren auf verschiedene

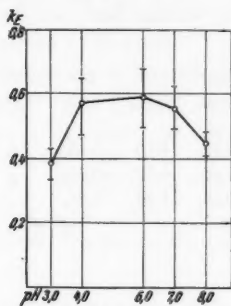


Abb. 4

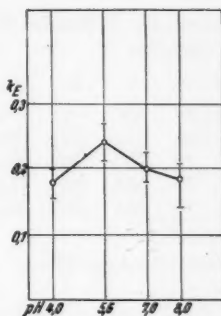


Abb. 5

Abb. 4. *Salvinia natans*; Plasmolyse in 0,25 GM KNO_3 McIlvaine-Puffer.Abb. 5. *Salvinia natans*; Plasmolyse in 0,40 GM Glycerin McIlvaine-Puffer.

Wasserdurchlässigkeit des Protoplasmas. Einen Unterschied in der Harnstoff- und Glycerinpermeabilität beobachtete auch Hurch (1953) bei Epidermis- und Mesophyllzellen, doch war die Rückdehnung der Epidermiszellen 4 bis 5mal, die auf die Einheit der Oberfläche bezogene Permeabilität nur etwa 2mal schneller wie die der Mesophyllzellen.

Die nun folgenden Versuche sind alle mit Zellen des Mesophylls durchgeführt worden. Die Schnitte wurden in 0,70 GM Traubenzucker plasmolysiert und in 0,40 GM Traubenzucker deplasmolysiert. Die pH-Bereiche stellte ich mit Phosphatpuffer her. (1 Teil Puffer und 9 Teile Lösung.) Plasmolyse und Deplasmolyse wurde im gleichen pH-Bereiche durchgeführt.

pH 4,8

Die Protoplasten haben in diesem Bereiche sehr gute Formen.

Versuch 46 18. XI. 48 LT: 19° C

Der Schnitt lag 1 Stunde im Plasmolytikum.

Mittelwert (aus 3 Zellen) von $k_R = 0,05$.

pH 4,8

Versuch 47 18. XI. 48

LT: 19° C

Der Schnitt lag 2 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	51	28,5	30	34,8	21	0,42	0,45 ₁	0,54 ₅	0,06 ₂	12—17'
2	50	28	30,5	35	18	0,44	0,48 ₃	0,58	0,09 ₂	"
3	60	29	30,7	36	21	0,36 ₇	0,39 ₅	0,48 ₃	0,05 ₃	"
4	52	28,5	30,5	35	21	0,41 ₃	0,45	0,53 ₈	0,07 ₆	"
									283 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,07$.

Versuch 50 19. XI. 48

LT: 16° C

Der Schnitt lag 19 Stunden im Plasmolytikum. Gleiches Blatt, wie die vorhergehenden Versuche.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	83	22—	23—	27—	19	0,38 ₉	0,42 ₂	0,52 ₂	0,07 ₂	7—11'
	Tpr.	23	24,5	29						
2	58	27	29,5	35	18	0,36 ₂	0,40 ₃	0,50	0,08 ₄	"
3	73	32,5	35	43	18	0,36 ₄	0,39 ₃	0,50 ₇	0,06 ₄	"
4	65	27,5	29,5	36,5	14	0,35 ₁	0,38 ₁	0,48 ₈	0,05 ₆	"
									276 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,06_0$.

pH 6

Sehr guter Verlauf der Deplasmolyse. Der Endgrad der Deplasmolyse wird schon in der 17. bis 23. Minute erreicht. Bei pH 4,8 aber erst nach 50 bis 60 Minuten.

Versuch 53 19. XI. 48

LT: 19° C

Der Schnitt lag 2 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	40	23	24	26	18	0,42 ₅	0,45	0,50	0,15 ₇	4—7'
2	50	26	27	29,4	18	0,40	0,42	0,46 ₆	0,09 ₅	"
3	48	24	25	27	17	0,38 ₁	0,40 ₂	0,44 ₄	0,13 ₂	"
									384 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,12_8$.

Versuch 58 20. XI. 48

LT: 17° C

Der Schnitt lag 22 Stunden im Plasmolytikum. Zellen mit idealer Form. Systrophe bei der Plasmolyse.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	49	24,5	25,5	27,8	20	0,36 ₃	0,38 ₃	0,43 ₁	0,10 ₇	6—10'
2	53	27	28,8	31,1	19	0,39 ₄	0,42 ₅	0,47	0,13 ₅	"
3	61	33	35,5	39,3	29	0,38 ₂	0,42 ₄	0,48 ₃	0,13 ₆	"
									378 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,12_6$.

pH 7

Ballensystrophe bei allen Zellen. Die Deplasmolyse wird bei allen Schnitten ohne Schaden ertragen. Deplasmolyse-Endzeit ist in der 30. bis 35. Minute.

Versuch 57 19. XI. 48 LT: 20° C

Der Schnitt lag 3 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	45	24	26	29	22	0,37 ₇	0,41 ₆	0,48 ₂	0,12 ₃	6—10'
2	58	25	28	32	19	0,32 ₂	0,37 ₂	0,44 ₂	0,12 ₁	"
3	49	24	26	29,5	17	0,37 ₄	0,41 ₄	0,48 ₆	0,10 ₉	"
4	60	27,5	30	34	19	0,35 ₅	0,39 ₅	0,46 ₂	0,10 ₇	"
5	50	26	28	31,5	19	0,39 ₄	0,43 ₄	0,50 ₂	0,12	"
									585 : 5	

Mittelwert von $k_R = 0,11_7$

Versuch 59 20. XI. 48 LT: 17° C

Der Schnitt lag 21 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	54	24,3	26	28	17	0,34 ₅	0,37 ₆	0,41 ₃	0,13 ₇	8—12'
2	39	20	21	23	18	0,35 ₉	0,38 ₄	0,43 ₆	0,09 ₁	"
3	58	27	29	33	20	0,35	0,38 ₃	0,45 ₃	0,08 ₉	"
									317 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,10_6$

pH 8,7

Die Protoplasten haben immer gute Form. Die Deplasmolyse-Endzeit liegt zwischen der 45. und 55. Minute.

Versuch 49 18. XI. 48 LT: 19° C

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	57	27,5	30,8	36,8	19	0,37 ₃	0,43	0,53 ₃	0,08 ₇	9—14'
2	51	26,4	29	34	22	0,37 ₅	0,42 ₅	0,52 ₃	0,08 ₃	"
3	51	28	30	35	21	0,41 ₂	0,45 ₁	0,54 ₉	0,07 ₂	"
4	74	35	38	46	20	0,38 ₃	0,42 ₃	0,53 ₁	0,06 ₄	"
5	78	35	38	46	22	0,35 ₃	0,39 ₄	0,49 ₇	0,06 ₇	"
									374 : 5	

Mittelwert von $k_R = 0,07_5$

Versuch 51 19. XI. 48 LT: 17° C

Der Schnitt lag 19 Stunden im Plasmolytikum. Alle Zellen ertragen die Deplasmolyse ohne Schaden zu nehmen.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	60	26	28	35	20	0,32 ₂	0,35 ₅	0,47 ₂	0,05 ₃	10—14'
2	47	22	23,5	29	15	0,36 ₂	0,39 ₁	0,50 ₅	0,05 ₄	"
3	41	21,7	23	27	17	0,39	0,42 ₂	0,52	0,05 ₃	"
4	65	29	31	38	20	0,34 ₃	0,37 ₄	0,48 ₂	0,05	"
5	70	30,5	32,5	40,5	21	0,33 ₆	0,36 ₆	0,47 ₇	0,05 ₂	10—14'
									263 : 5	

Mittelwert von $k_R = 0,05_2$

Im Bereiche pH 6 wird der Gipfelpunkt erreicht, und die Kurve verläuft zum Neutralpunkt in fast gleicher Höhe (Abb. 6). Von diesen beiden Punkten sinken die Werte der Rückgangskonstanten in das saure und das alkalische Bereich ab. Die Deplasmolyse-Endzeiten verhalten sich gleichsinnig, sie sind im leicht sauren Bereiche pH 6 am kürzesten.

Die Plasmolyse von der angegebenen Dauer sowie die Deplasmolyse während der Messung waren für das Plasma ohne schädigenden Einfluß, was durch zwei Tatsachen erhärtet wird.

Bei der Plasmolyse kommt es immer zu einer Systrophe, die in vielen Fällen auch während der Deplasmolyse bestehen bleibt. Das Auftreten einer Systrophe kann aber nach Germ (1932) als Beweis einer gut verlaufenden und unschädlichen Plasmolyse gelten.

Die Dauer der Plasmolyse hatte in meinen Versuchen keinen entscheidenden Einfluß auf die Wasserpermeabilität. In einzelnen Versuchen lagen die Schnitte 1 bis 3, bzw. 19 bis 22 Stunden im Plasmolytikum.

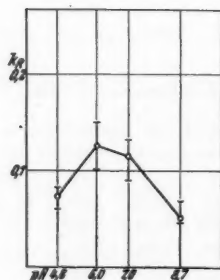


Abb. 6

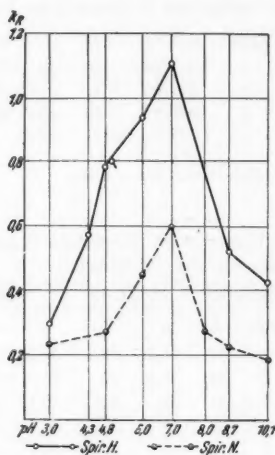


Abb. 7

Abb. 6. *Vallisneria spiralis*; Plasmolyse in 0,70 GM Dextrose — Deplasmolyse in 0,40 GM Dextrose. Phosphatpuffer.

Abb. 7. *Spirogyra* sp.; Plasmolyse in 0,70 GM Dextrose — Deplasmolyse in 0,45 GM Dextrose. α_{∞} ... ohne Puffer, nur mit bidest. Wasser. Phosphatpuffer.

5. Versuche mit *Spirogyra* und mit *Cladophora*

Ich verwendete drei verschiedene *Spirogyra*-Formen, die sich durch geringe Wasserpermeabilität auszeichneten, das osmotische Gleichgewicht spät erreichten und gegen die schädlichen Einflüsse der Plasmolyse und Deplasmolyse wenig empfindlich waren. (Die Bezeichnungen entsprechen nicht den von Eibl [1939] verwendeten.)

Spirogyra H

Vegetative Zellen sind 29 bis 35 μ breit, mit nicht gefalteten Querwänden. Der Kern ist oval und liegt nicht zentral, sondern vielleicht im Wandplasma-schlauch. *Spirogyra* H hat einen Chromatophor, die Zellmembran ist dünnwandig. Diese Form besitzt hohe osmotische Werte, im Traubenzucker ist O ... 0,35 bis 0,42 GM. Kopulation und Zygoten sind unbekannt. Die Messungen wurden mit Herbstmaterial durchgeführt. Plasmolyse mit anschließender partieller Deplasmolyse in Traubenzucker. Gemessen wurde die Rückdehnung. Die pH-Reihen wurden mit Phosphatpuffer (S. 151) eingestellt.

Spirogyra N

Vegetative Zellen sind 29 bis 35 μ breit, mit nicht gefalteten Querwänden. Der Kern ist rund und wandständig. Die Zellmembran ist dünnwandig, ein Chromatophor. Er ist breiter als bei *Spirogyra* H, mit der sie leicht verwechselt werden kann. Als Unterscheidungsmerkmal dienten mir die niederen osmotischen Werte, in Traubenzucker ist O ... 0,24 bis 0,26 GM. Verwendet wurde Herbstmaterial, auch sonst waren die Versuchsbedingungen dieselben wie bei *Spirogyra* H.

Spirogyra L

Vegetative Zellen sind 35 bis 40 μ breit, mit nicht gefalteten Querwänden. Der Kern ist rund, ein Chromatophor. Leiterförmige Kopulation, Zygoten ($43 \times 70 \mu$) mit abgerundeten Polen.

Das Material wurde im Frühjahr gemessen. Plasmolyse in 0,50 GM KNO_3 . Die Lösungen wurden mit McIlvainpuffer eingestellt.

Die Messungen bei *Spirogyra* H und *Spirogyra* N fanden während der Deplasmolyse statt, da der Eintritt der Plasmolyse konkav erfolgte. Diostomikum war eine Lösung von Traubenzucker in abgekochtem und filtriertem Standortwasser.

Die zu kurzen Stücken zerschnittenen Algenfäden (10 mm) nahm ich mit einem Glasstab, dessen Spitze zu einem haarförmigen Häkchen ausgezogen war, aus der Lösung, bzw. dem Standortwasser und legte die Fäden (10 bis 20 Stück) auf den Objekträger. Unter dem Mikroskop suchte ich dann die gewünschte Form heraus, befestigte den Faden mit einem Glasplättchen, deckte ab, und die Messung begann.

Aus der großen Zahl von Versuchen, die in dieser Versuchsreihe gemacht wurden, kann nur ein kleiner Teil hier gebracht werden. Ich habe die Auswahl aus einer Anzahl gleicher Versuche immer so getroffen, daß der Versuch, welcher den Mittelwerten der übrigen entspricht oder nahekommt, mitgeteilt wird.

Spirogyra H

Plasmolyse in 0,70 GM Traubenzucker, Deplasmolyse in 0,45 GM Traubenzucker. Phosphatpuffer.

pH 3

Von 17 gemessenen Zellen gingen 9 während des Versuches zugrunde. Die Protoplasten dehnten sich zuerst normal bei der Deplasmolyse aus, schrumpften aber dann

plötzlich zusammen und starben ab. Der Bereich pH 3 ist eben für *Spirogyra* schon stark schädigend.

Versuch 13. X. 48 LT: 15° C

Die Zellen lagen 2½ Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l ₁	l ₂	l	b	g ₁ '	g ₂ '	G'	k _R	Zeit
1	35	27	28	34	13	0,64 ₃	0,67 ₇	0,84 ₃	0,23 ₁	1—2'
2	41	29	30,5	41	13	0,60 ₂	0,64 ₁	0,89 ₆	0,27 ₆	"
3	43	27	29	34,8	12	0,53 ₃	0,57 ₉	0,71 ₄	0,36 ₂	"
									869 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,28_9$.

pH 4,3

Auch in diesem pH-Bereich sterben noch viele Zellen während des Aufenthaltes in den Lösungen ab. Doch kommen oft Fäden mit lebenden Zellen vor. Der folgende Versuch stammt von solchem Material.

Versuch 50 20. X. 48 LT: 15,5° C

Die Zellen lagen 1½ Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l ₁	l ₂	l	b	g ₁ '	g ₂ '	G'	k _R	Zeit
1	46	29	33	36,5	12,3	0,54 ₂	0,62 ₃	0,70 ₂	0,69 ₅	30''—1' 30''
2	60	30	35	39	12	0,43 ₃	0,51 ₇	0,58 ₃	0,49 ₁	"
3	36	24,5	27	29	14	0,55	0,61 ₉	0,67 ₂	0,53 ₃	"
4	38	26,5	28	31	14	0,57 ₁	0,61 ₃	0,69 ₂	0,56	"
									2 279 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,57$.

Die Zellen 1, 2 und 3, 4 sind jeweils von einem Faden.

pH 4,8

Die Mehrzahl der Zellen leben im Faden und ertragen die Deplasmolyse ohne Schaden. Sehr gute Form der Protoplasten im Plasmolytikum.

Versuch 104 8. XI. 48 LT: 20° C

Die Zellen lagen 1 Stunde im Plasmolytikum.

Zelle	h	l ₁	l ₂	l	b	g ₁ '	g ₂ '	G'	k _R	Zeit
1	46	28	30	32	13	0,51 ₃	0,55 ₆	0,60 ₂	0,76	30''—1' 30''
2	46	27	28,5	30	13	0,49 ₄	0,52 ₆	0,55 ₃	0,79	"
3	47	27	29	31	13	0,48 ₃	0,52 ₆	0,56 ₃	0,79 ₁	"
									2 341 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,78$.

Alle Lösungen mit bidestilliertem Wasser (pH 5 bis pH 6) ohne Puffer.

In diesen Lösungen wird die Plasmolyse und Deplasmolyse ohne Schaden ertragen. Ich habe diese Versuche hier aufgenommen, da die Werte der Rückgangskonstanten gut in den Verlauf der Kurve passen (vgl. Abb. 7).

Versuch 1 13. X. 48 LT: 15° C

Die Zellen lagen 2 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁ '	<i>g</i> ₂ '	<i>G</i> '	<i>k_R</i>	Zeit
1	52	40	42	45	13	0,68 ₇	0,72 ₃	0,79 ₃	0,79 ₃	2—3'
2	32,5	39	41	44,3	13	0,66 ₂	0,69 ₉	0,76 ₂	0,69 ₃	"
3	50	40,5	42,5	45,3	13	0,72 ₄	0,76 ₄	0,82	0,89 ₃	"
									2 384 : 3	

Mittelwert von $k = 0,79_3$.

Versuch 7 14. X. 48 4 Stunden im Plasmolytikum

Der Mittelwert (6 Zellen) von $k_R = 0,75_3$.

pH 6

Dieses pH-Bereich ist wieder mit Puffer eingestellt. Der Deplasmolyseverlauf ist sehr gut. Die meisten Zellen leben.

Versuch 80 23. X. 48 LT: 17° C

Die Zellen liegen 1 Stunde im Plasmolytikum.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁ '	<i>g</i> ₂ '	<i>G</i> '	<i>k_R</i>	Zeit
1	53	30	35	40,5	12,5	0,48 ₅	0,57 ₉	0,68 ₅	0,81	30"—1' 30"
2	55	31	36,5	42	12,5	0,49 ₆	0,59 ₆	0,69 ₁	0,94 ₃	"
3	57	33,5	38,8	44,5	12,5	0,51 ₆	0,60 ₇	0,70 ₅	0,88 ₃	"
4	56	34	39	43	12,5	0,53 ₄	0,62 ₃	0,69 ₅	1,14 ₅	"
									3 784 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,94_6$.

pH 7

Plasmolyse und Deplasmolyse werden in diesem Bereiche sehr gut ertragen. Die Deplasmolyse-Endzeiten liegen zwischen der 4. und 6. Minute.

Versuch 81 23. X. 48 LT: 17° C

Die Zellen lagen 21 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	<i>h</i>	<i>l</i> ₁	<i>l</i> ₂	<i>l</i>	<i>b</i>	<i>g</i> ₁ '	<i>g</i> ₂ '	<i>G</i> '	<i>k_R</i>	Zeit
1	54	27	33	36	12	0,42 ₉	0,53 ₇	0,59	1,23	30"—1' 30"
2	55,5	28	34,5	37,5	12,5	0,42 ₉	0,54 ₄	0,60	1,23	"
3	56	28	33,8	37	12,5	0,42 ₇	0,53	0,58 ₇	1,11	"
4	49	26,5	30	33	12,5	0,45 ₃	0,52 ₇	0,58 ₃	0,87 ₂	"
									4 442 : 4	

Mittelwert von $k_R = 1,11$.

Versuch 76 22. X. 48 LT: 17° C 2 Stunden im Plasmolytikum. Der Mittelwert (aus 4 Zellen) von $k_R = 1,48$.

pH 8,7

Ungefähr die Hälfte der Zellen gingen bei der Plasmolyse zugrunde, die Deplasmolyse wurde gut ertragen. Die Form der Protoplasten ist immer sehr gut.

Versuch 13 14. X. 48 LT: 15° C

Die Zellen lagen 3 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	50	38	40	44,5	12	0,68 ₄	0,72	0,82	0,48	1—2'
2	51	40	42	46,8	12	0,70 ₆	0,74 ₃	0,84	0,57 ₃	"
3	51	40	42,3	48	12	0,70 ₆	0,75 ₁	0,86 ₃	0,53 ₁	"
4	60	42	43,5	47	12	0,63	0,65 ₅	0,71 ₇	0,48	"
									2 064 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,51_6$.

Versuch 25 16. X. 48 LT: 15° C

Die Deplasmolyse-Endzeit wird im Bereiche pH 8,7 in der 15. bis 18. Minute erreicht.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	47	26	29	36	13	0,46 ₂	0,52 ₆	0,67 ₄	0,39 ₅	30''—1' 30''
2	42	25	28	33	13	0,49 ₃	0,56 ₃	0,68 ₃	0,53 ₁	"
3	58	35	38,5	45	13	0,52 ₉	0,59	0,70 ₂	0,54 ₂	"
4	49	34,5	36,5	39,5	13	0,61 ₆	0,65 ₄	0,71 ₆	0,65 ₁	"
									2 119 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,52_9$.

pH 10

Hier im alkalischen Bereiche ist der Grad der Schädigung naturgemäß am größten, trotzdem plasmolysieren auch noch viele Zellen sehr gut. Im allgemeinen sind die Werte von k_R niedrig, doch gibt es auch Zellen mit hohen Werten, und es ist noch schwer zu entscheiden, was die Regel und was abnormal ist. Die beiden folgenden Versuche wurden mit einwandfreiem und gesund aussehendem Material ausgeführt.

Versuch 17 15. X. 48 LT: 15° C

Die Zellen liegen 3 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	68	51,5	56,5	63	12	0,69 ₇	0,77 ₃	0,86 ₇	0,93 ₄	30''—1' 30''
2	75	57	61	68,3	12	0,70 ₆	0,76	0,85 ₇	0,70	"
3	81	60,5	65	72	12	0,69 ₈	0,75 ₃	0,84	0,78 ₈	"
									2 422 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,80_7$.

Versuch 21 15. X. 48 LT: 16° C

Die Zellen lagen 5 Stunden im Plasmolytikum.

Zelle	h	l ₁	l ₂	l	b	g ₁ '	g ₂ '	G'	k _R	Zeit
1	51	33	35	41	12	0,56 ₀	0,60 ₈	0,72 ₀	0,37 ₃	30''—1' 30''
2	84	57	63	76	11,5	0,63 ₄	0,70 ₈	0,86	0,56 ₂	"
3	98	59	65	80,5	11,5	0,56 ₃	0,62 ₀	0,78 ₃	0,44 ₃	"
4	92	61,5	64	75,8	12,	0,62 ₈	0,65 ₈	0,78	0,33 ₃	"
									1715 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,42_0$.*Spirogyra N*

Das Verhalten dieser Form in den verschiedenen p-H Bereichen ist das gleiche wie das von *Spirogyra H*. Der osmotische Wert dieser Alge ist sehr niedrig und beträgt bei der Plasmolyse in Traubenzucker 0,24 bis 0,26 GM.

Plasmolyse in 0,70 GM Traubenzucker, Deplasmolyse in 0,45 GM Traubenzucker. Phosphatpuffer.

pH 4,3

Mittelwert von $k_R = 0,23_0$. Aus drei Versuchen mit 8 Zellen.

pH 4,8

Mittelwert von $k_R = 0,26_8$. Aus zwei Versuchen mit 8 Zellen.

pH 6

Mittelwert von $k_R = 0,45$. Aus drei Versuchen mit 9 Zellen.

pH 7

Mittelwert von $k_R = 0,60$. Aus zwei Versuchen mit 6 Zellen.

pH 8

Mittelwert von $k_R = 0,27_4$. Aus zwei Versuchen mit 9 Zellen.

pH 8,7

Mittelwert von $k_R = 0,23_8$. Aus zwei Versuchen mit 7 Zellen.

pH 10

Mittelwert von $k_R = 0,18_8$. Aus zwei Versuchen mit 4 Zellen.

Die Werte der Rückgangskonstanten der Plasmolyse sind im Vergleich zu *Spirogyra H* sehr klein.

Die k_R -Werte sind im Bereiche pH 7 bei beiden *Spirogyra*-formen am größten und werden im alkalischen sowie im sauren Bereiche kleiner (Abb. 7). Auch die Deplasmolyse-Endzeiten zeigen denselben Verlauf, sie sind bei pH 7 am kürzesten, im sauren und alkalischen Bereiche am längsten. Was den Einfluß der Dauer der Plasmolyse auf die bei folgender partieller Deplasmolyse bestimmte Wasserpermeabilität betrifft, so fand ich ihn sehr gering und in vielen Versuchen überhaupt nicht festzustellen. Der geringste Grad der Schädigung herrscht im leicht sauren und im neutralen Bereiche.

Cladophora glomerata

Cladophora glomerata gehört zu den Siphonocladiales und hat vielkernige, coenocytische Zellen. Ich verwendete bei den Versuchen die jüngsten Zellen der Seitenäste. Zur Messung nahm ich eine Form, deren Zellmembran bei der Deplasmolyse nicht aufquillt. Das starke Haftvermögen des Plasmas an die Zellwand und ein konkaver Plasmolyseeintritt gestatteten die Messungen nur während der Deplasmolyse.

Diosmotikum war in allen Versuchen Traubenzucker. Die Plasmolyse fand in 1,0 GM, die folgende partielle Deplasmolyse in 0,80 GM Traubenzucker statt. Alle Lösungen setzte ich mit bidestilliertem Wasser an. Beide Arten von Lösungen wurden mit Phosphatpuffer auf ein bestimmtes pH-Bereich eingestellt.

In jedem Versuche wurden vier bis fünf Zellen untersucht. In den ersten zwei bis drei Minuten wurde die Rückdehnung in Abständen von 30 Sekunden, später alle drei bis vier Minuten gemessen.

pH 4,8

Die Deplasmolyse wird in diesem Bereiche sehr gut ertragen. Die Protoplasten sind immer gut geformt.

Versuch 23		29. X. 48		LT: 17,5° C		1 Stunde im Plasmolytikum.				
Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	123	75	87	113	31,3	0,52 ₅	0,62 ₅	0,83 ₄	0,30 ₁	30''—1' 30''
2	122	76	89	117,5	30,5	0,53 ₉	0,64 ₄	0,88	0,34 ₅	"
3	105	68	78	96,5	31	0,55	0,64 ₃	0,82 ₁	0,29 ₂	"
4	121	80	90	111,5	30	0,57 ₈	0,66 ₁	0,83 ₈	0,31 ₉	"
									1 257 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,31_4$.

Bei zwei weiteren Versuchen in pH 4,8 haben die Mittelwerte der Rückgangskonstanten folgende Größen: $k_R = 0,36$ und $0,40$.

pH 6

Auch in diesem Bereiche sind die Zellen voll lebensfähig und zeigen bei der Plasmolyse und Deplasmolyse keinen Schaden.

Versuch 52		4. XI. 48		1 Stunde im Plasmolytikum. LT: 16° C						
Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	85	60	69,5	77	28	0,59 ₇	0,70 ₈	0,79 ₇	0,66 ₉	30''—1' 30''
2	85	64	72	78	29	0,63 ₉	0,73 ₄	0,84	0,55 ₃	"
3	102	69	78,5	86,3	24	0,59 ₈	0,69	0,76 ₇	0,64 ₂	"
4	75	59	65,5	70,8	23	0,68 ₄	0,77 ₁	0,84 ₂	0,73	"
									2 594 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,65$.

Bei zwei Versuchen im gleichen pH ist der Mittelwert von k_R 0,72, bzw. 0,56.

pH 7

Die Deplasmolyse-Endzeit wird hier schon in der 8. Minute erreicht, bei pH 4,8 aber erst in der 15. bis 18. Minute. Plasmolyse und Deplasmolyse üben keinen schädigenden Einfluß auf die Zellen aus.

Versuch 42		3. XI. 48		1 Stunde im Plasmolytikum. LT: 18° C						
Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	94	67	73	77,5	23,5	0,63	0,69 ₅	0,74 ₄	0,70 ₅	30''—1' 30''
2	85	63,5	72	78	18,5	0,67 ₅	0,77 ₄	0,84 ₅	0,79 ₆	"
3	86	65	72	77	18,5	0,68 ₄	0,76 ₅	0,82 ₄	0,78 ₅	"
									2 289 : 3	

Mittelwert von $k_R = 0,76_5$.

Bei anderen Versuchen bewegen sich die Werte von k_R zwischen 0,65 und 0,85.

pH 8

Das Plasmolyse- und Deplasmolysebild ist in allen Versuchen sehr gut. Die Deplasmolyse-Endzeit in der 9. bis 14. Minute.

Versuch 47		4. XI. 48		1½ Stunden im Plasmolytikum. LT: 16° C						
Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	78	54	60,5	65,5	25	0,58 ₆	0,67 ₁	0,73 ₄	0,67 ₈	30''—1' 30''
2	87	57	64	69	25	0,56	0,64 ₁	0,69 ₉	0,66 ₄	"
3	80	55	59	62,8	25	0,58 ₄	0,63 ₄	0,68 ₂	0,54 ₅	"
4	85	58	63	68	25	0,58 ₅	0,64 ₁	0,70 ₂	0,54 ₃	"
									2 430 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,60_7$.

Weitere Mittelwerte von k_R aus anderen Versuchen sind von der Größe 0,48 und 0,66.

pH 8,7

Sehr gute Form der Protoplasten bei der Deplasmolyse, die ohne Schädigung ertragen wird. Deplasmolyse-Endzeit in der 12. bis 16. Minute.

Versuch 55		5. XI. 48		1 Stunde im Plasmolytikum. LT: 19° C						
Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1'	g_2'	G'	k_R	Zeit
1	113	79	82,7	89	29	0,61 ₂	0,64 ₆	0,70 ₂	0,36 ₉	30''—1' 30''
2	102	68	74,5	82	33	0,55 ₉	0,62 ₂	0,69 ₆	0,45 ₈	"
3	120	69	75	96,5	34	0,48 ₁	0,53 ₁	0,71	0,33 ₄	"
4	127	76	84,5	94	35	0,50 ₇	0,57 ₅	0,64 ₃	0,44 ₈	"
									1 609 : 4	

Mittelwert von $k_R = 0,40_2$.

Bei weiteren Versuchen ergibt sich ein Mittelwert von $k_R = 0,48$ und 0,54.

Cladophora glomerata ist gegen die schädlichen Einflüsse der cH sehr unempfindlich, nur im stark alkalischen Bereiche pH 10 kommt es zu einer sichtbaren Schädigung des Plasmas.

Im neutralen Bereiche sind die Werte der Rückgangskonstanten am größten und sinken von hier in den alkalischen sowie in den sauren Bereich ab (Abb. 8).

Aus den bisher besprochenen Versuchen kann die Lage des Gipfelpunktes der Kurven noch nicht eindeutig festgelegt werden. Die Messungen erfolgten in zu weit auseinanderliegenden pH-Bereichen, so daß eine Entscheidung, ob der Gipfelpunkt der Kurve beim IEP oder beim Neutralpunkt liegt, noch nicht möglich ist.

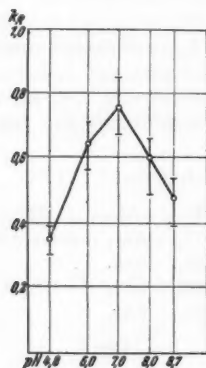


Abb. 8

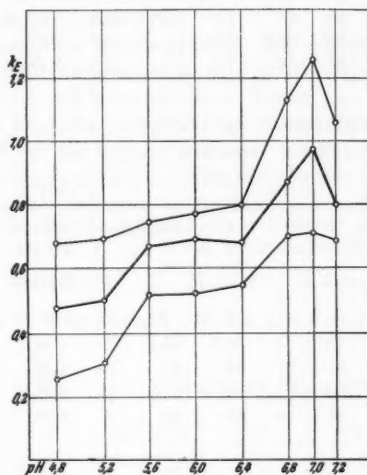


Abb. 9

Abb. 8. *Cladophora glomerata*; Plasmolyse in 1,0 GM Dextrose — Deplasmolyse in 0,80 GM Dextrose. Phosphatpuffer.

Abb. 9. *Spirogyra L*; Plasmolyse in 0,50 GM KNO_3 McIlvain-Puffer. Die mittlere Kurve verbindet die Mittelwerte, die äußeren Kurven die niedersten und höchsten Werte von k_g .

Ich stellte daher, als mir das gesamte frühere Beobachtungsmaterial ausgewertet vorlag, im Frühjahr 1949 noch eine Versuchsreihe an, die der Entscheidung der Frage um die Lage des Gipfelpunktes der cH-Kurve galt. Ich prüfte die Eintrittsgeschwindigkeit der Plasmolyse in acht pH-Bereichen zwischen pH 4,8 und pH 7,2 (pH 4,8; 5,2; 5,6; 6,0; 6,4; 6,8; 7,0; 7,2). Die pH-Reihe wurde mit McIlvain-Puffer eingestellt.

Das Material zu diesen Versuchen bildeten Spirogyren, die ich im Frühjahr (22. bis 26. April) aus dem Wasserpark in Floridsdorf holte. Von den vorhandenen Algen wählte ich eine Form von *Spirogyra* aus, die sich durch einen langsamen Plasmolyseverlauf und sehr schöne konvexe Protoplastenformen beim Plasmolyseeintritt in KNO_3 (nicht aber in Traubenzucker) auszeichnete. Diese *Spirogyra* ist an dem hellen und durchsichtigen Bau ihrer Zellen leicht zu erkennen und im untersuchten Material zahlreich vertreten. Ein weiterer Vorteil dieser Form war der Umstand, daß sie fruchtete. Die

Kopulation erfolgt leiterförmig, der Kopulationskanal wird von beiden Zellen gebildet und ist an der Verschmelzungsstelle stark aufgetrieben. Die aufnehmenden Zellen sind an der der Partnerzelle zugekehrten Seite schwach angeschwollen. Die Zygoten sind ellipsoidisch mit abgerundeten Polen. Das Exospor ist dünn, glatt und farblos. Eine vorgebildete Rifflinie konnte nicht beobachtet werden, da die Zygoten noch nicht gereift waren. Die vegetativen Zellen sind 35 bis 40 μ breit, mit einem Chromatophor, der locker im Zellraum liegt (zwei bis drei Windungen).

Der Kern ist rund und schmiegt sich in der Mitte der Zelle an ein Pyrenoid an.¹

Spirogyra L

Plasmolyse in 0,50 GM KNO₃. Lösungsmittel ist abgekochtes und filtriertes Standortwasser. McIlvain-Puffer.

pH 4,8

Versuch 121 22. IV. 49 LT: 17° C

Sehr gute Form der Protoplasten ab Beginn des Plasmolyseeintrittes.

Zelle	h	l ₁	l ₂	l	b	g ₁	g ₂	G	k _E	Zeit
1	29	29	27	15	13,5	0,84 ₀	0,77 ₀	0,36 ₃	0,25 ₄	1—2'
2	35	34,5	30	16,2	13,5	0,85 ₀	0,72 ₀	0,33 ₄	0,44	"
3	34,5	33,3	29,3	16,3	13,5	0,83 ₀	0,71 ₀	0,40	0,51 ₀	"
4	40	39,5	34	18	13,5	0,87 ₀	0,73 ₀	0,33 ₇	0,47 ₄	"
										1 684 : 4

Mittelwert von $k_E = 0,42_1$.

Ein weiterer Versuch im gleichen pH-Bereiche zeigt einen Mittelwert von $k_E = 0,56_3$ (3 Zellen).

Der Mittelwert aus allen Messungen: $k_E = 0,48_2$.

pH 5,2

Versuch 132 25. IV. 49 LT: 18° C

Sehr gute Form der Protoplasten bei der Plasmolyse.

Zelle	h	l ₁	l ₂	l	b	g ₁	g ₂	G	k _E	Zeit
1	34	34	31	20,7	13	0,87 ₃	0,78 ₅	0,48 ₂	0,42 ₂	3—4'
2	34	33,5	31	22	13	0,85 ₀	0,78 ₅	0,52	0,40	"
3	30	27	25	20	13	0,75 ₀	0,69	0,52 ₃	0,50	"
4	30	29	27,5	21	13	0,82 ₃	0,77 ₃	0,55 ₀	0,33	"
										1 652 : 4

Mittelwert von $k_E = 0,41_3$.

In zwei Versuchen haben die Zellen folgende Werte von k_E : 0,48₂; 0,68₃; 0,58₀. Aus allen berechneten Werten ist der Mittelwert von $k_E = 0,50_6$.

¹ Nach Czurdas Bestimmungsschlüssel könnte die Form der *Spirogyra lacustris* (vgl. Czurda 1932, Seite 176) entsprechen, die aber bisher nur aus dem Lunzer See, also von ganz anderem Biotop, bekannt ist.

pH 5,6

Versuch 123 23. IV. 49

LT: 18° C

Alle Zellen leben und sind plasmolysiert.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	33	28	23,5	16,8	13	0,71 ₈	0,58 ₂	0,37 ₉	0,66	2-3'
2	32	26	22	17	13	0,68	0,55 ₂	0,39 ₇	0,72 ₇	"
3	26	19,5	17	14,5	13	0,58 ₄	0,48 ₈	0,39 ₂	0,73	"

2 117 : 3

Mittelwert von $k_E = 0,70_6$.

In zwei Versuchen im gleichen pH-Bereiche haben die Zellen Werte von k_E : 0,74; 0,66₂; 0,68₂; 0,64₄; 0,52₆. Der Mittelwert der Eintrittskonstanten aus allen Versuchen ist $k_E = 0,67$.

pH 6

Versuch 124 23. IV. 49 LT: 18,5° C

Alle Zellen sind plasmolysiert und leben.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	28	23,7	19,7	15,3	14	0,67 ₈	0,53 ₂	0,37 ₈	0,77 ₄	2-3'
2	51	42	36	23,7	14	0,73 ₂	0,61 ₄	0,37 ₂	0,53 ₂	"
3	26	21	17,7	14	14	0,62 ₈	0,50	0,35 ₈	0,71 ₈	"

2 023 : 3

Mittelwert von $k_E = 0,67_4$.

In einem andern Versuch ist k_E 0,75₀ und 0,70₂, daraus ergibt sich aus allen Messungen ein Mittelwert von $k_E = 0,69_7$.

pH 6,4

Versuch 134 26. IV. 49 LT: 17° C.

Alle Zellen leben und sind plasmolysiert.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	32	21,5	19	17,5	13,5	0,51 ₂	0,45 ₂	0,40 ₆	0,80 ₈	3-4'
2	38	27	24	20	13,5	0,59 ₂	0,51 ₂	0,40 ₈	0,61 ₄	"
3	37	25	22,5	20,5	13,5	0,55 ₄	0,48 ₄	0,43 ₂	0,78 ₈	"
4	36	24,8	22,5	19,5	13,5	0,56 ₄	0,50	0,41 ₆	0,72	"

2 927 : 4

Mittelwert von $k_E = 0,73_2$.

Weitere Werte von k_E im gleichen pH-Bereiche sind: 0,59; 0,65; 0,62₂; 0,80₂; 0,59₄; 0,54₄; 0,68; 0,64₈; 0,62; 0,79₂. Der Mittelwert aus allen Messungen ist $k_E = 0,67_6$.

pH 6,8

Versuch 126 23. IV. 49

LT: 19° C.

Alle Zellen leben bei der Plasmolyse.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	31	30	23,5	15,6	14	0,81 ₄	0,60 ₇	0,35 ₂	0,84	1-2'
2	31	29,5	22	15	14	0,80	0,55 ₈	0,33 ₂	0,96 ₇	"
3	34	30	22	15	14	0,74 ₄	0,50 ₆	0,30 ₂	0,93	"
4	33	29,5	22	15	14	0,75 ₁	0,52 ₄	0,31 ₂	0,90 ₆	"
5	37	31,5	24	16	14	0,72 ₈	0,52 ₁	0,30 ₆	0,81 ₅	"

4 461 : 5

Mittelwert von $k_E = 0,89_2$.

Bei zwei Versuchen im Bereiche pH 6,8 sind die Werte von k_E : 1,13; 0,92; 0,75; 0,70; 0,81. Der Mittelwert aus allen Messungen ist für k_E : 0,87.

pH 7,0

Versuch 142 26. IV. 49 LT: 19,5° C
Alle Zellen sind lebend und gut plasmolysiert.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	32	22	17	15,3	13,5	0,54 ₇	0,39 ₁	0,33 ₇	1,23	2—3'
2	31,5	22	17,8	15,7	13,5	0,55 ₈	0,42 ₂	0,35 ₅	0,84 ₈	"
3	29,5	23	18	15	13,5	0,62 ₇	0,45 ₈	0,35 ₈	1,03	"
4	28,5	20	16	14	13,5	0,54 ₄	0,40 ₄	0,33 ₃	1,01	"
									4 118 : 4	

Mittelwert von k_E = 1,02.

In zwei weiteren Versuchen haben die Zellen folgende Werte von k_E : 1,25; 1,15; 0,91; 0,71; 0,81. Der Mittelwert aus sämtlichen Messungen ergibt einen Wert von k_E = 0,97.

pH 7,2

Versuch 127. 23. IV. 49 LT: 19° C
Sehr gute Form der Protoplasten, alle Zellen leben und sind plasmolysiert.

Zelle	h	l_1	l_2	l	b	g_1	g_2	G	k_E	Zeit
1	34	32	26	17	13,5	0,80 ₈	0,63 ₂	0,36 ₈	0,72 ₃	1—2'
2	34	33	26,5	18	13,5	0,83 ₈	0,64 ₈	0,39 ₇	0,83 ₈	"
3	34	33	26	17,5	13,5	0,83 ₈	0,63 ₂	0,38 ₂	0,87 ₃	"
4	33	31,5	24,8	17	13,5	0,81 ₈	0,61 ₅	0,37 ₈	0,87 ₆	"
5	34	32	25,5	17	13,5	0,80 ₉	0,61 ₈	0,36 ₈	0,80	"
									4 115 : 5	

Mittelwert von k_E = 0,82.

Weitere Versuche im gleichen pH-Bereiche ergaben für k_E folgende Werte: 0,93; 0,69; 0,70; 0,79; 1,06; 0,71; 0,69; 0,70. Der Mittelwert aus allen Messungen für k_E = 0,80.

Der Verlauf der Plasmolyse in KNO_3 ist bei *Spirogyra* L in allen untersuchten pH-Bereichen sehr gut. Die Eintrittsgeschwindigkeit der Plasmolyse nimmt von pH 4,8 bis pH 7,0 zu und erreicht im neutralen Bereiche selbst den größten Wert. Die Kurve, welche die kleinsten Werte von k_E in den gemessenen Bereichen verbindet (vgl. Abb. 9, untere Kurve), zeigt am besten das Verhalten der Zellen bei der Plasmolyse bezüglich der Eintrittsgeschwindigkeit.

6. Besprechung und Zusammenfassung

Die Zellen der Wasserblätter von *Salvinia natans* zeigen bei der Plasmolyse in KNO_3 in den Bereichen pH 4, pH 6 und pH 7 ziemlich gleichgroße Werte der Eintrittskonstanten. Im stark sauren und im alkalischen Bereiche sind aber die Werte von k_E wesentlich kleiner. Bei der Plasmolyse in Glyzerin sind die Wertunterschiede von k_E in den gemessenen pH-Bereichen sehr klein (0,15 bis 0,27), so daß über diese Meßergebnisse nur gesagt werden

kann, daß die Werte von k_E in den Bereichen pH 4 und pH 8 die niedrigsten sind, die dazwischenliegenden pH-Bereiche aber größere Werte aufweisen.

Bei den Mesophyllzellen von *Vallisneria* liegt der Gipfelpunkt der Kurve im Bereiche pH 6, sinkt sehr flach zu pH 7, aber nach links steil zu pH 4,8 ab.

Der Gipfelpunkt der Kurven liegt bei allen drei untersuchten *Spirogyra*-Formen und auch bei *Cladophora* um den Neutralpunkt. Von hier fallen die Werte bei diesen Versuchspflanzen steil zum sauern und alkalischen Bereiche ab.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas, beurteilt nach der Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse, wird durch die Wasserstoffionenkonzentration der Versuchslösungen stark beeinflusst, was in einer Erhöhung oder Herabsetzung der Eintritts- und Rückgangskonstanten zum Ausdruck kommt.

Die Eintritts- und Rückgangskonstanten erreichen in der Gegend um den Neutralpunkt ihren höchsten Wert und sinken zum sauern und alkalischen Bereiche ab. Die Kurven der Wasserpermeabilität in Abhängigkeit zur cH sind eingipfelig.

Die chemische Eigenart der Diosmotika (Traubenzucker, KNO_3), der verwendeten Puffer (Phosphat-, Zitratpuffer) sowie der Vorgang der Messung (während der Plasmolyse oder Deplasmolyse) sind, im ganzen gesehen, für die Wirkung der cH von untergeordneter, bzw. ohne Bedeutung.

Meine Ergebnisse stimmen also gut mit denen von L. und M. Brauner (1943) überein. In beiden Untersuchungen wurden eingipfelige Kurven für die cH-Abhängigkeit der Wasserpermeabilität gefunden. Ob die Wasserpermeabilität im IEP wirklich ihren höchsten Wert erreicht, wie Brauner schließt, oder ob die Wasserpermeabilität im neutralen pH-Bereiche am größten ist, kann aus allen bis jetzt vorliegenden Versuchen noch nicht mit allgemeiner Gültigkeit entschieden werden. Bei den von mir genau untersuchten *Spirogyra*-formen liegt der Gipfelpunkt der Kurve im neutralen pH-Bereiche, was ich in einer Versuchsreihe mit vielen pH-Graden in kleinen Abständen (mit *Spirogyra* L., Abb. 9) aufs neue bestätigt fand.

Die Eingipfeligkeit der Wasserpermeabilitätskurven innerhalb einer pH-Reihe, wie sie Brauner beschrieben hat, wird aber von mir bestätigt. Brauner nimmt nun an, daß der Gipfelpunkt der Kurven mit dem IEP des Plasmas (pH 5,3) zusammenfällt. Wenn ich die höchsten Werte der Kurven beim Neutralpunkt finde, so steht dieses Ergebnis mit Brauners Versuchen nicht in Widerspruch, da der genannte Autor gerade bei den vergleichbaren Berechnungen der Plasmolysegrade diese nur bei weit auseinanderliegenden pH-Stufen bestimmt hat. Es geht daher aus seinen Beobachtungen noch nicht eindeutig hervor, ob der in den Kurvendarstellungen gezeichnete Gipfelpunkt tatsächlich mit dem höchsten Punkt der Kurve zusammenfällt.

Brauners Messungen würden somit meine Ergebnisse nicht ausschließen. Im übrigen war auch das Versuchsmaterial verschieden. Brauner arbeitete mit Innenepidermen der Zwiebelshuppen von *Allium cepa*

und Stengelepidermen von *Phlomis tuberosa*, während meine Untersuchungen an *Spirogyra*, *Cladophora*, *Vallisneria* und *Salvinia* durchgeführt wurden.

A priori läßt sich die Annahme, daß die Wasserpermeabilität gerade im IEP ihr Maximum erreicht, wohl nicht erschließen, denn wir wissen ja nicht, ob es die Ampholyte des Plasmas sind, die begrenzend für seine Wasserpermeabilität wirken.

Die cH-Abhängigkeit der Wasserpermeabilität steht im Gegensatz zu der der Glycerin- und Harnstoffpermeabilität. Nach orientierenden Beobachtungen von Rottenburg (1943) gibt es dort meist im Bereiche zwischen pH 4 und pH 6 ein leichtes Minimum. Bei der Mehrzahl der Zellobjekte, deren Plasma seinen Permeabilitätseigenschaften nach dem „Lösungstyp“ angehört (*Lamium purpureum*, *Taraxacum officinalis*) erfolgt im alkalischen Bereiche ein neuerlicher, starker, sicher faßbarer Anstieg der Kurve. Aus diesem Verhalten konnte von Rottenburg die Folgerung gezogen werden, daß die gelösten Stoffe auf dem Lösungsweg durch die lipoide Phase des Plasmas permeieren. Das Wasser benutzt aber nach allgemeiner Annahme bei seinem Durchtritt durch das Plasma den Porenweg (im Sinne Collanders), es geht durch die „hydroide Phase“. Höfler (1949) hat vor kurzem gezeigt, daß der maßgebende Permeationswiderstand für den Wasserdurchtritt wahrscheinlich nicht in den Hautschichten, sondern im Binnenplasma seinen Sitz hat. Mit der aus zahlreichen Versuchen schon gut erforschten *Gentiana Sturmi*ana (vgl. Höfler-Stiegler [1921, 1930]) untersuchte Höfler (1949) aufs neue die Wasserpermeabilität. *Gentiana Sturmi*ana gehört dem rapiden Harnstofftyp an und zeigt große Unterschiede in der Permeabilität des Harnstoffes zwischen Epidermis- und Parenchymzellen. Die Wasserpermeabilität ist aber, wie Höfler (1949) feststellt, bei beiden Gewebearten von der gleichen Größenordnung. Das gegensätzliche Verhalten der Epidermis- und Parenchymzellen bei der Harnstoffpermeabilität und das gleichsinnige Verhalten bei der Wasserpermeabilität läßt sich mit der Grenzschichtentheorie nicht erklären. Nur die Annahme, daß das Binnenplasma für den Wasserdurchtritt begrenzend wirkt, kann Verständnis in die oben erwähnten Versuchsergebnisse bringen.

Wenn einmal in Zukunft versucht werden wird, aus der Beeinflussung der Wasserpermeabilität durch die cH Schlüsse auf die Struktur des Binnenplasmas zu ziehen, so sind einige ganz sichere Ergebnisse der Diskussion zugrunde zu legen. Solche sind bisher:

1. Die Wasserpermeabilität nimmt von pH 7 nach der alkalischen Seite ab, die Harnstoff- und Glycerinpermeabilität steigt hingegen beim Lösungstyp in diesem Bereiche an.

2. Die Wasserpermeabilität nimmt ebenso vom Neutralpunkt zum sauren Bereiche ab, gleichlaufend damit aber auch die Harnstoff- und Glycerinpermeabilität.

Die mitgeteilte Versuchsreihe bildet einen Teil meiner Untersuchungen über die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Die Mitteilung weiterer Befunde ist geplant.

Die Versuche wurden im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien durchgeführt. Es sei gestattet, dem Vorstande des Institutes, meinen verehrten Lehrer, Herrn Prof. Karl Höfler, für die Anregung der Arbeit und seine ständige Hilfe auch an dieser Stelle den besten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Richard Biebl für wertvolle Unterstützung bei der Arbeit.

Literatur

- Bochsler, A., 1948, Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas auf Grund des Fickschen Diffusionsgesetzes. Ber. d. Schweiz. Bot. Ges. 58, 73.
- Brauner, L. u. M., 1943, Studies in the relation between water permeability and electric charge in membrane models and in living plant cells. Revue Fac. scient. de L'Univ. d'Istanbul. Serie B VII., 4. 1943.
- Brenner, W., 1918, Die Empfindlichkeit und Permeabilität pflanzl. Protoplasten für Säuren und Basen. Öfv. af Finska Vetenskaps. Soc. LX., 1917 u. 1918.
- Clark, W. M., 1928, The Determination of Hydrogen Ions. Third Edition. Baltimore. Williams & Wilkins.
- Collander, R., 1930, Permeabilitätsstudium an *Chara ceratophylla*. I. Die normale Zusammensetzung des Zellsaftes. Acta bot. Fenn. 6, 1.
- 1932, Permeabilität. Handwörterbuch der Naturwissenschaften, 2. Aufl., 7, 805.
- Czurda, V., 1932, Zygnemales. Paschers Süßwasserflora, Heft 9.
- Eibl, K., 1932, Plasmolytische Untersuchungen an den Plastiden von *Spirogyra*. Protoplasma 33, 161.
- Frey-Wyssling, A., 1946, Zur Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Experientia, II/4, 132.
- und v. Rechenberg-Ernst, 1943, Über die Wasserpermeabilität der Epithemzellen von Hydathoden. Flora N.F. 37, 193.
- Germ, H., 1932/33, Untersuchungen über systrophische Inhaltsverlagerung in den Pflanzenzellen nach Plasmolyse. Protoplasma 14, 566; 17, 509.
- Haan, Iz. de, 1933, Protoplasmaquellung und Wasserpermeabilität. Rec. de trav. bot. Néerl. 30, 234.
- Höfler, K., 1918 a, Eine plasmolytisch-volum. Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Pflanzenzellen. Denkschrift d. Wiener Akad. d. Wiss. 95, 99.
- 1918 b, Permeabilitätsbestimmung nach der plasmometrischen Methode. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 36, 414.
- 1930, Über Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse. Jb. f. wiss. Bot. 73, 300.
- 1931, Plasmolyseverlauf und Wasserpermeabilität. Protoplasma 12, 564.
- 1949, Wasser- und Harnstoffpermeabilität des Protoplasmas. Phytion 1, 105.
- Hofmeister, L., 1939, Die Wasserpermeabilität der Zellen des Drüsenepithems von *Saxifraga*. Protoplasma 33, 399.
- Hüber, B., 1933, Beiträge zur Kenntnis der Wasserpermeabilität des Protoplasmas. I. Permeabilitätsunterschiede zwischen Epidermis und Mesophyll im *Vallisneria*-Blatt. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 41, 53.
- und Höfler, K., 1930, Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jb. für wiss. Bot. 73, 351.
- Hurch, H., 1933, Beiträge zur Kenntnis der Permeabilitätsverteilung in den verschiedenen Geweben des Blattes. Beih. z. Bot. Centralbl. Abt. I, 50, 211.
- Iljin, W., 1928, Die Durchlässigkeit des Protoplasmas. Protoplasma 3, 558.

- Jacobs, M. H., 1927, The exchange of materials between the erythrocyte and its surroundings. The Harvey Lectures 22, 146.
- and Steward, D. R., 1932, A simple method for the quantitative measurement of cell permeability. Journal of Cellular and Comparative Physiology 1, No. 1.
- Lepeschkin, W. W., 1910, Zur Kenntnis der Plasmamembran II. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 28, 384.
- Levitt, J. — Scarth, G. W. — Gibbs, R. D., 1936, Water permeability of isolated protoplasts in relation to volum change. Protoplasma 26, 237.
- Rottenburg, W., 1943, Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glycerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Flora N.F. 37, 230.
- Sörensen, S. P. L., 1909, Biochemische Zeitschrift 21, 175.
- Strugger, S., 1938, Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora N.F. 32, 253.
- Welcher, F. I., 1947, Chemical solutions. New York. D. van Nostrand Company.

Zur Elektrophysiologie von Drüsenprotoplasma

Von

Rudolf Keller

(The Madison Foundation for Biochemical Research, Inc. New York)

(Eingelangt am 22. Februar 1949)

Der interessante Beitrag zur Elektrophysiologie pflanzlicher Drüsen von Th. Diannelidis (1948) macht es sehr wahrscheinlich, daß bei der Produktion von Drüsen-Sekreten die elektrischen Kräfte des Zellprotoplasmas eine bedeutende Rolle spielen. Die letzten Jahre haben eine große Zahl von Tatsachen sichergestellt, die nach derselben Richtung weisen wie die Untersuchungen von Diannelidis an Nektarien. Zwei englische Physiologen und ein Physiker R. E. Davis, N. M. Langmuir und E. E. Crane haben (Nature 159: 468, 1947) den natürlichen Strom der Magendrüsen gemessen, dann den natürlichen Strom durch einen Gegenstrom von ungefähr gleicher elektromotorischer Kraft und Stromdichte kompensiert und den natürlichen Strom durch einen zusätzlichen Strom verdoppelt. In dem ersten Fall wurde wenig oder keine Salzsäure produziert, in dem zweiten Fall viel mehr als normal. Zumindest die Salzsäureproduktion des Magens ist also von elektrischen Kräften dominierend beeinflusst. Ungefähr zu der Zeit der Publikation des physiologischen Laboratoriums von Sheffield wurden in diesem Laboratorium vitalfärberische Versuche am Verdauungskanal wirbelloser Tiere durchgeführt, die in elektrischer Deutung dasselbe Resultat ergeben. Unsere Versuche haben gezeigt, daß es fast immer sehr alkalische Drüsen sind, welche Säure erzeugen und saures Protoplasma, welches alkalisches Sekret erzeugt, zum Beispiel die Brunnerdrüsen des oberen Darms. Nach unserer Hypothese wird die Säure durch elektrolytisches Absaugen des Natriums in das Blut erzeugt. Die Versuche mit radioaktivem Natrium haben ergeben, daß das Natrium des Mageninhalts mit großer Geschwindigkeit ins Blut abgeführt wird. Das Abtransportieren des Natriums durch das Blut ist wahrscheinlich wichtig, aber nicht ausschlaggebend. Das Wurzelzellenprotoplasma, welches in der Umgebung der Wurzel Säure erzeugt, ist so alkalisch wie das Plasma der Belegzellen des Magens und hat keine mechanische Zirkulation. Auch das Protoplasma der Assimilationszellen, welche die Säure der Vakuolen erzeugt, ist negativ und alkalisch.

Wir haben mit unserer vitalfärberischen Methodik auch die Säureproduktion der Nierentubuli untersucht, von denen wir die Elektronegativität schon in Prag (mit J. Gicklhorn) bestimmt hatten. Auch die Niere oder die Nephridien niederer Tiere erzeugen einen sauren Harn durch die Tätigkeit der elektronegativen Drüsen Epithelien. Die Versuche von Montgomery and D. A. Pierce (1937) in Philadelphia haben gezeigt, daß

auch in der Niere von *Necturus* die Azidität des Harns durch das Verschwinden des Natriumbikarbonats produziert wird.

Im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Drüsenprotoplasmas sei hier auf eine Arbeit von Burch und Reaser von New Orleans hingewiesen, die mit der Isotopen Technik nachgewiesen haben, daß durch den Körper des Menschen täglich 20 Pfund Kochsalz vom Blut in die Gewebe gehen und ins Blut zurückkehren. Diese interessante Arbeit über eine lange unbekannte und unsichtbare Zirkulation in großem Maßstab ist sowohl in Amerika als in Europa sehr wenig beachtet worden. Sie ist, wie ich glaube, sehr wichtig. Wir Menschen, auch die Naturforscher, sind vor allem visuelle Tiere. Wir überschätzen die sichtbare Zirkulation und haben die sehr große Bedeutung der unsichtbaren Zirkulation der niederen Tiere und der Pflanzen oft übersehen. Unsere Urahren, die Einzeller haben keine oder sehr wenig mechanische Kräfte, keine Muskeln, kein Herz, keine Darmperistaltik. Die mechanischen Kräfte sind ein Ergebnis der Entwicklung der letzten zweihundert Millionen Jahre. Wenn wir selber, die Menschen, nach der Konzeption noch Einzeller sind, müssen wir auch ohne mechanische Kräfte auskommen und Nahrungszufuhr und Ausscheidung nichtmechanisch durchführen. Die gegenwärtige Zellphysiologie arbeitet noch sehr stark mit mechanischen und chemischen Kräften, die elektrischen Attraktions- und Abstoßungskräfte, die in Zellentfernungen sehr stark sind, werden gewöhnlich unterschätzt.

Der erste, der erkannt hat, daß in dem lebenden Protoplasma Stoffbewegungen und Wassertransporte in charakteristischen Richtungen geschehen, war Paul Ehrlich um 1890. Sein Versuch der nichtmechanischen Komponente des Wassertransports und gewisser anderer Transporte mittels Injektionen von Fluorescein zu folgen, war eine epochemachende Idee und vollkommen korrekt, wie F. P. Fischer (1929) später nachgewiesen hat. Ehrlich war der Vorgänger von G. von Hevesy mit dessen radioaktiven Isotopen, damals noch eine rohe unquantitative Methode. Ein halbes Jahrhundert lang wurde die Bedeutung seiner Methodik nicht voll erfaßt. F. P. Fischer, J. Gicklhorn, Ellinger und Hirt haben seine Methode mit modernen Apparaten und Farbstoffen ausgebaut. Dank ihnen haben wir heute eine qualitative Tracer Analyse, welche gewisse vorsichtige Schlußfolgerungen erlaubt. Das Eindrucksvollste, was diese Autoren und wir gefunden haben, ist die überraschende Schnelligkeit der unsichtbaren Stoffbewegung und Zirkulation. Die obenerwähnte Schätzung von Burch und Reaser ist nach unseren experimentellen Erfahrungen ein wenig zu niedrig. Die Isotopenforscher prüfen nach 5 Minuten, wie viel Radioaktivität in einem Gewebe — zum Beispiel aus dem Blut — angekommen sind. Es wird übersehen, daß die Partikel mit ungeheurer Schnelligkeit weiterwandern und daß die Resultate aller Radioanalysatoren deshalb nur Minimalziffern sind. Während sie messen, ist der größere Teil der bewegten Substanz längst weitergewandert, wie man mit der Ehrlichschen Methode mit Fluorescein oder mit beliebigen anderen ultravioletten Reagenzien immer wieder sehen kann.

Wir glauben, daß es elektrische kataphoretische Transporte sind, die in primitiven Tierzellen und in Pflanzenzellen die meisten Stoffbewegungen

erzeugen, auch die Sekretionen der Drüsen, die manchmal nicht einfache Sekretionen sind, sondern Absaugungen von Stoffen zusammen mit wirklichen Ausscheidungen,

Was uns in unserer Arbeit sehr ermutigt hat, war die Tatsache, daß, wenn man die gefärbten und ungefärbten Körperstoffe nicht nach den alten Ionen ordnet, sondern nach R. Hoebbers (1905) Potentialmessungen an Nerven und Muskeln in Berührung mit ihnen, man auf einem unabhängigen Weg die extrazellularen und intrazellularen Gruppen erhält. (Exp. Medicine und Surgery, 1948). Unabhängig davon können diese biologisch positiven und negativen Stoffe auch nach ihrer Verteilung im Körper oder nach ihrer Verteilung in Testobjekten geordnet werden. Es kommen immer wieder dieselben antagonistischen Gruppen heraus, die also eine bedeutsame Rolle im Protoplasma spielen müssen. Sie sind ferner in den lyophilen Reihen von Hofmeister und Spiro enthalten und von Spiro in seinen letzten Lebensjahren als elektrostatische Reihen gedeutet worden.

Nach meinen Erfahrungen gibt es zwei große Gruppen von Stoffen, die im Protoplasma der Tiere und Pflanzen in entgegengesetzter Richtung wandern. Die eine Gruppe ist die extrazelluläre, von den deutschen Forschern die Säftegruppe von Stoffen genannt, und die andere Gruppe, die intrazelluläre in Amerika (nach A. B. Hastings), oder die Gewebsgruppe von Forster (1877) oder von Wiechowski (1925). Ich habe die extrazelluläre Gruppe die Natriumgruppe genannt und die intrazelluläre die Kaliumgruppe. Meine Gruppen haben mehr Mitglieder als die älteren Zusammenfassungen, die meisten basischen Farbstoffe gehören zur intrazellulären, die Mehrzahl der sauren Farbstoffe sind extrazellulär in amerikanischer Terminologie, die meisten Vitamine und Enzyme sind intrazellulär, ebenso die meisten Hormone mit Ausnahme des Schilddrüsenhormons und einiger Hypophysenhormone.

Mit unseren ultravioletten Farbstoffen können wir gewisse Flüssigkeiten im Körper, die für ruhend gehalten wurden, als in unsichtbarer kontinuierlicher Bewegung nachweisen, was schon Ehrlich in scheinbar ruhendem Kammerwasser demonstriert hat. Wir geben nach einem blauen positiven Farbstoff einen gelben und sehen den blauen an bestimmten Stellen verschwinden und den gelben an anderen Pforten eindringen.

Die Entdeckung der radioaktiven Isotopen hat die Physiologie der Zellflüssigkeiten und der Granula revolutioniert. Alles ist in fortwährender Zirkulation und die alten Moleküle werden durch neue ersetzt. Was wir von unseren Vätern erben, ist nicht etwa das Hundertstel Milligramm Keimplasma, 80% davon auswechselbares Körperwasser, was wir erben, ist eine Anzahl von mikroelektrischen Kraftfeldern von einem bestimmten Muster, die die Nahrungsmoleküle und das Wasser in bestimmten Linien auf die Gliedmaßen verteilen, und zwar immer andere Moleküle. Dauernd in den Generationen sind hauptsächlich die erbeigten Kraftfelder, die vielleicht nicht immer nur elektrostatisch sein müssen.

Die physiologische Theorie ist zur Zeit noch vollkommen mechanisch und chemisch. Eine ganz kleine Minorität von Forschern in Europa und Amerika, deren Zentrum „Protoplasma“ seit seiner Gründung gewesen ist, inter-

essierte sich stark für die Mikrophysik der lebenden Zelle. Es ist erfreulich, daß „Protoplasma“ nun wieder erscheint, und es ist zu wünschen, daß im Laufe von Jahren die kleine biophysikalisch eingestellte Minderheit zu einer Mehrheit wird.

Literatur

- Burch, G., and P. Reaser I, 1947. D. Labor. and Clin. Med. **32**, 1169.
Chaillet Bert, E. E. Peyre et F. Bertillon, 1927, C. r. Soc. de Biol. **97**, 1676, Paris.
Diannelidis, T., 1948, Beitrag zur Elektrophysiologie pflanzlicher Drüsen. Phytion **1**, 7.
Fischer, F. P., J. Gicklhorn, 1929, Kolloidchem. Beihefte **28**, 210.
Hoerber, R., Pflügers Arch. **106**; 599, 1905.
Keller, R., 1947, Exp. Med. and Surgery **5**, 163.
— 1948, Rev. of Gastroenterol. **15**, 561.
— and B. V. Pisha, 1947, Vital Staining of *Daphnia* Nephron. Anat. Rev. **98**, 39.
Montgomery, H., and D. A. Pierce, Am. d. Physiol. **118**, 44, 1937.
Schulemann, W., 1917. Biochem. Zeitschr. **80**, 1.
Singer, E., 1936. Anat. Rec. **66**, 343.
Spiro, K., in Elektrostatik i. d. Biochemie, 1929. Kolloidchem. Beihefte **28**, 210.
Wilbrandt, W., 1937. J. Gen. Physiol. **20**, 534 (unter Hoerber).

Die intravitale Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch die obere Zwiebel-schuppenepidermis von *Allium Cepa*

Von

Ernst Siegfried Perner

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster)

Mit 5 Textabbildungen

(Eingelangt am 6. August 1949)

Das Problem der intravitale Aufnahme bzw. Nichtaufnahme sulfosaurer Farbstoffe durch pflanzliche Zellen und Gewebe ist trotz vieler Untersuchungen bisher noch weitgehend ungelöst geblieben. Nicht nur die Versuchsergebnisse sind zum Teil stark widersprechend, sondern noch viel größer sind die Differenzen in der theoretischen Deutung der Beobachtungstatsachen. So stehen sich heute auf Grund der neueren Arbeiten zwei Auffassungen gegenüber:

1. Der lebende Protoplast ist für sulfosaure Farbstoffe im Sinne eines Ultrafilters permeabel, wobei das Permeationsvermögen in erster Linie durch den Dispersitätsgrad des Farbstoffes und die Aufnahmegeschwindigkeit durch das Speicherungsvermögen der Zelle bestimmt wird (Strugger 1937; Drawert 1940, 1941).

2. Der lebende Protoplast ist für sulfosaure Farbstoffe impermeabel bzw. seine Durchlässigkeit ist unmeßbar klein. Eine Anfärbung ist daher in den meisten Zellen nicht möglich. Wenn in Ausnahmefällen eine Aufnahme erfolgt, ist eine „adenoider Tätigkeit“ des Protoplasten im Sinne Overtons dafür verantwortlich zu machen. Darunter ist ein von der Atmung abhängiger, unter Arbeitsaufwand stattfindender aktiver Stofftransport durch physiologisch dazu befähigte Protoplasten zu verstehen (Collander 1921, 1942; Collander und Holmström 1937; Collander und Virtanen 1938).

Seit den ersten positiven Befunden Pfeffers (1886) und Overtons (1900), die eine langsame Aufnahme von Methylorange und Tropaeolin OO (erst nach 20 und 48 Stunden feststellbar) durch das Plasma der Wurzelhaare von *Trianea bogotensis* und die Vakuolen von *Spirogyra communis* beobachteten, ist immer wieder über eine intravitale Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Farbstoffe berichtet worden (Küster 1912, 1940; Ruhland 1913; Schaeede 1923; Scarth 1926; Strugger 1932; Rehm 1935; Collander und Holmström 1937; Drawert 1941). In diesen Arbeiten konnte an den verschiedensten Objekten eine Speicherung durch

die Vakuolen, seltener durch das Plasma lebender Zellen festgestellt werden. Vor allem sind es die Parenchymzellen längs der Leitbündel und die durch eine intensive Atmung ausgezeichneten Blütenblattzellen höherer Pflanzen, die zu einer bevorzugten Speicherung von Sulfosäuren befähigt sind.

Diesen Beobachtungen einer Aufnahme sulfosaurer Farbstoffe stehen nun Untersuchungen gegenüber, in denen eine vitale Speicherung nicht festgestellt werden konnte. Die vorher angeführten Ergebnisse werden zum Teil einer Kritik unterzogen und die Autoren kommen zu dem Schluß, daß „physiologisch nicht ausgezeichnete Zellen“ nur im Falle einer nekrotischen Schädigung zu einer Aufnahme und Speicherung von Sulfosäuren befähigt sind, nicht aber in voll lebensfähigem Zustand. Collander (1921) fand, daß die meisten Pflanzenzellen Sulfosäuren nicht bis zum Konzentrationsausgleich aufzunehmen vermögen. Eine Ausnahme machen die Parenchymzellen der Leitbündelscheiden und jugendliche, noch im Wachstum befindliche Zellen. Die beobachtete Zellsaftfärbung wird durch hohe Wasserstoffionenkonzentration gefördert und durch Narcoticis gehemmt. Zu den Versuchen Ruhlands macht Collander geltend, daß diejenigen Zellen, die eine stärkere Speicherung beobachten ließen, einen abnorm niedrigen Turgor besaßen, unregelmäßige Plasmolyseformen zeigten und nicht mehr deplasmolysierbar waren. Ruhland müsse demnach mit absterbenden Zellen gearbeitet haben.

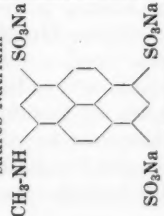
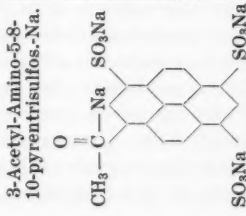
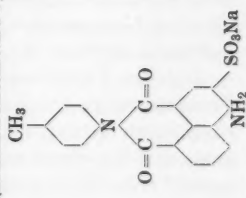
Ebenso widersprechend sind die Ergebnisse über den Einfluß des elektrischen Stromes auf die Färbbarkeit mit Sulfosäuren. Banus (1927) und Höber (1933) stellten nach Durchleiten eines elektrischen Stromes bei *Spirogyra* ein vorübergehendes Permeieren von Cyanol und Säurefuchsin in die Vakuolen fest. Gicklhorn und Dejdar (1931) konnten dagegen bei einer Wiederholung der Versuche nachweisen, daß nur geschädigte *Spirogyra*-Zellen saure Farbstoffe nach elektrischer Reizung zu speichern vermögen und vertreten die Ansicht, daß der elektrische Strom, sofern doch eine Wirkung auf die intravitale Farbstoffaufnahme vorhanden sein sollte, die Speicherungsqualitäten der Zelle ungleich stärker beeinflusst als die Permeabilität. Suolahti (1937) zeigte aber im Gegensatz zu diesen Befunden, daß der elektrische Strom die vitale Aufnahmefähigkeit der Internodialzellen von *Chara ceratophylla* für sulfosaure Farbstoffe nicht verändert.

Der Collanderschen Auffassung von der Impermeabilität der Plasmagrenzschichten für Sulfosäuren schließen sich nicht alle Zellphysiologen an. Strugger (1937) wendet ein, daß nicht die Permeabilität der entscheidende Faktor für eine Anfärbung ist, sondern daß das Speichervermögen des Zellinhalts für die Aufnahme oder Nichtaufnahme verantwortlich ist. Saure Farbstoffe mit hohem Dispersitätsgrad können ebenso wie die entsprechenden basischen Farbstoffe in die lebende Zelle permeieren. Der hemmende Faktor für eine optisch nachweisbare Aufnahme liegt nach dieser Auffassung in dem mangelnden Speichervermögen des Protoplasten für Sulfosäuren in den meisten pflanzlichen

Tab. 1. Die Eigenschaften der verwendeten Fluorochrome.

Fluorochrom	Eigenfarbe (pH)	Fluoreszenzfarbe (pH)	Dissoziationsverhalten (pH)	Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln	Dispersität
3-oxy-5-8-10-pyren-trisulfosaures Natrium <chem>Oc1ccc2c(c1)ccc3c2c(S(=O)(=O)O)cc(S(=O)(=O)O)c3S(=O)(=O)O</chem>	3,0 kaum wahrnehmbar grün 5,5 stärker laubgrün 7,5 deutlich laubgrün einfarbiger Indikator!	3,0 stark-seegrün (X 19 la) 5,5 Mischfluoreszenz 7,5 stark laubgrün (XIV 24 pa) zweifarbiger Fluoreszenzindikator!	3,0 nicht dissoziiert 5,9 Beginn der Dissoziation 8,8 maximal dissoziiert kolorimetrisch und Metaphoretisch	In Benzol, Toluol, Chloroform, Terpen-tinöl in allen pH-Werten unlöslich	hochdiffusibel
3-10-oxy-5-8-pyren-disulfosaures Natrium <chem>Oc1ccc2c(c1)ccc3c2c(S(=O)(=O)O)cc(S(=O)(=O)O)c3O</chem>	3,0 schwach gelblich 4,8 zunehmende Farbvertiefung 7,0 deutlich laubgrün einfarbiger Indikator! (im Licht und im Dunkeln unbeständig, wird braun)	3,0 stark eisblau (XIII 16 la) 4,8 Mischfluoreszenz 7,5 stark laubgrün (XIV 23 pa) zweifarbiger Fluoreszenzindikator!	3,0 nicht dissoziiert 5,6 Beginn der Dissoziation 8,5 maximal dissoziiert kolorimetrisch und kataphoretisch	unlöslich	hochdiffusibel
3-Amino-5-8-10-pyren-trisulfosaures Natrium <chem>Nc1ccc2c(c1)ccc3c2c(S(=O)(=O)O)cc(S(=O)(=O)O)c3S(=O)(=O)O</chem>	schwach grüngelb pH-unabhängig	stark laubgrün (XII 23 na) pH-unabhängig	3,0 nicht dissoziiert 4,0 nicht dissoziiert Beginn der Diss. 6,0 maximal dissoziiert kataphoretisch ermittelt	unlöslich	hochdiffusibel

3-Monomethyl-Amino-5-8-10-pyren-trisulfosaures Natrium	schwach grüngelb pH-unabhängig	stark laubgrün (XIV 24 pa)	3,0 nicht dissoziiert 4,0 nicht dissoziiert	unlöslich	hochdiffusibel
--	-----------------------------------	----------------------------	--	-----------	----------------

<p>3-Monomethyl-Amino-5-8-10-pyrentrisulfonsaures Natrium</p> 	schwach grüngelb pH-unabhängig	stark laubgrün (XIV 24 pa) pH-unabhängig	3,0 nicht dissoziiert 4,0 nicht dissoziiert Beginn der Diss. 6,0 maximal dissoziiert kataphoretisch	unlöslich	hochdiffusibel
<p>3-Acetyl-Amino-5-8-10-pyrentrisulfos.-Na.</p> 	ohne Eigenfarbe pH-unabhängig	stark ultramarinblau (XIII 16 la) pH-unabhängig	3,5 nicht dissoziiert Beginn der Diss. 5,0 maximal dissoziiert kataphoretisch	unlöslich	hochdiffusibel
<p>4-Amino-p-Naphthalin-1-8-dicarbonsäureimid-3-sulfosaures Natrium (Brillantsulfoflavin FF)</p> 	schwach gelblich pH-unabhängig	stark laubgrün (X 23 la) pH-unabhängig	3,0 nicht dissoziiert 6,0 Beginn der Diss. 8,5 maximal dissoziiert kataphoretisch	unlöslich	hochdiffusibel

Zellen. Zu dem gleichen Schluß kommt auch Drawert (1941), nach dessen Ansicht das Speicherungsvermögen einer lebenden Zelle für saure Farbstoffe durch das Vorhandensein von Zwischenprodukten bestimmt wird, die im Verlauf eines intensiven Stoffwechsels entstehen und die eine besondere Affinität zu den sauren Farbstoffen aufweisen. Die Nichtaufnahme von Sulfosäuren bei vielen Zellen wird durch das Fehlen eines derartigen Stoffwechsels erklärt.

Schon aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß es bisher nicht möglich gewesen ist, die beobachteten Erscheinungen theoretisch zu analysieren. Die Ursachen für diese Unklarheiten können vielleicht in der angewandten unzureichenden Methode zu suchen sein. Da die Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Farbstoffe im allgemeinen gering ist, kann angenommen werden, daß die Speicherung sich in allen Fällen überhaupt nicht nachweisen läßt, was wohl im besonderen für die bisher in der Literatur verwendeten Hellfeldfarbstoffe (Diachrome) zutreffen mag. Mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome) hoher Nachweisempfindlichkeit ist dieses Problem bisher aber noch nicht bearbeitet worden.

Es ist zu erwarten, daß mit Hilfe der fluoroskopischen Analyse die Aufnahme stark fluoreszierender sulfosaurer Farbstoffe in lebende Zellen wesentlich besser und exakter verfolgt werden kann, da schon geringe Spuren in den Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes beobachtet und lokalisiert werden können. Die hohe Nachweisempfindlichkeit dieser Methode ist durch die neueren Arbeiten (Strugger 1940, 1941, 1945; Kölbl 1947, 1948) erwiesen worden und nach Kölbl einzuordnen zwischen der geruchsinlichen Wahrnehmbarkeit des Mercaptans und der elektroskopischen Nachweismethode der Radioaktivität. Es ergibt sich als weiterer Vorteil, daß die Giftwirkung im Vergleich zu Diachromen auf ein Minimum eingeschränkt werden kann.

Mit fluoreszierenden Sulfosäuren liegen systematische Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus, wie sie mit basischen Fluorochromen bereits seit Jahren durchgeführt worden sind, überhaupt nicht vor. Es soll das Ziel dieser Arbeit sein, die Mechanik der Aufnahme und Speicherung von Sulfosäuren durch lebende Pflanzenzellen und Gewebe einer solchen Analyse zu unterziehen.

Auswahl der Fluorochrome und ihre Eigenschaften

Die zur Diskussion stehenden Fragen können nur durch die Auswahl feindisperser Fluorochrome gelöst werden, da diese am ehesten die Gewähr bieten, den Permeationswiderstand der als Ultrafilter im Sinne Ruhlunds wirkenden Plasmagrenzschichten zu überwinden, denn eine Lösung in den lipoiden Grenzschichten (Diasolyse) erscheint infolge der völligen Lipoid-unlöslichkeit dieser Fluorochrome von vornherein unwahrscheinlich.

Für den Färbvorgang ist die Permeabilität aber nur die notwendige Voraussetzung; entscheidend für den optischen Nachweis ist die Speicherung durch Strukturen der lebenden Zelle. Da aus der Literatur hervorgeht, daß das Speicherungsvermögen der normalen Pflanzenzelle für sulfosaure Farbstoffe wesentlich geringer zu sein scheint als für basische, sind

nur besonders nachweisempfindliche, stark fluoreszierende Sulfosäuren für derartige Untersuchungen geeignet.

In einigen Pyren-sulfosäuren und dem Naphthalsäureimid Brillantsulfoflavin FF wurden geeignete Fluorochrome gefunden, die beide Bedingungen erfüllen. Das oxy-pyren-trisulfosaure Natrium fand in der experimentellen Zellphysiologie zum erstenmal bei Farbstoffanstiegsversuchen zum Nachweis der extrasfaskulären Komponente des Transpirationsstromes durch Strugger (1959) Verwendung. Außerdem wurden noch Versuche mit vier weiteren Pyren-sulfosäuren durchgeführt, die sich durch verschieden angelagerte Radikale voneinander unterscheiden und über die Veröffentlichungen noch nicht vorliegen. Brillantsulfoflavin FF, das von Strugger (1946) zur Fluorochromierung von Bakteriensporen empfohlen wird, nimmt auf Grund seiner Struktur eine gewisse Sonderstellung ein.

Um Aussagen über die Mechanik des Aufnahme- und Speichervorgangs bei der Fluorochromierung lebender Zellen machen zu können, ist die Kenntnis bestimmter chemischer und physikalischer Eigenschaften eine unbedingte Voraussetzung. In Vorversuchen wurde daher die Löslichkeit in Wasser und in organischen Lösungsmitteln, die Abhängigkeit der Eigen- und Fluoreszenzfarbe vom pH-Wert der Lösungen, der Dissoziationsgrad in der Abhängigkeit vom pH-Wert und schließlich der Dispersitätsgrad ermittelt. Alle Angaben beziehen sich auf gepufferte Lösungen der Fluorochrome in einer Verdünnung von 1 : 10 000 (0,01%), wie sie auch zu den eigentlichen Fluorochromierungsversuchen verwendet wurden.

Die Vorversuche sollen an dem folgenden Beispiel besprochen werden. Die charakteristischen Eigenschaften aller verwendeten Fluorochrome sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

5-oxy-5-8-10-pyren-trisulfosaures Natrium.

Die gepufferte Lösung besitzt bei saurer Reaktion bis zu pH 5,5 nur eine kaum wahrnehmbare Eigenfarbe, die sich mit zunehmendem pH-Wert vertieft, so daß oberhalb von pH 7,5 die Lösungen deutlich laubgrün gefärbt erscheinen. Es handelt sich demnach um einen einfarbigen Indikator. Auch die Fluoreszenzfarbe ist pH-abhängig. Die sauren Lösungen zeigen bis zu pH 5,6 eine stark seegrüne Fluoreszenz (X 191a, nach der kleinen Farbmeßtafel von Ostwald). Mit steigendem pH-Wert verändert sich die Fluoreszenz durch Beimischung laubgrüner Farbtöne, so daß die Lösungen vom Neutralpunkt ab stark laubgrün (XIV 24 pa) fluoreszieren. Oxy-pyren-trisulfosaures Natrium ist also auch ein zweifarbiges Fluoreszenzindikator. Zur Bestimmung des Dissoziationszustandes wurden Lösungen mit gesetzmäßig variiertem pH-Wert einer Kataphorese unterzogen. Aus der Höhe des Farbstoffanstiegs im anodischen Schenkel, der Geschwindigkeit der Wanderung und der Fluoreszenzintensität konnte nach fünf Minuten dauerndem Versuch mit ausreichender Genauigkeit auf den Dissoziationszustand geschlossen werden. Von pH 5,5 bis pH 8,2 nimmt die Stärke der kataphoretischen Wanderung mehr und mehr zu, so daß im alkalischen Bereich das Maximum erreicht wird. Diese Angaben fanden ihre Bestätigung durch die kolorimetrische Bestimmung der Dissoziationskurve (Disso-

ziationsgrad in Abhängigkeit vom pH-Wert), die in diesem Falle anwendbar war, da oxypyrentrisulfosaures Natrium auch als Diachrom Indikator-eigenschaften aufweist.

Nach der von Kölbel (1947) angegebenen Methode ergab sich, daß der Farbstoff in den Lösungen des alkalischen Bereichs bis zu pH 8,8 vollständig dissoziiert vorliegt. Bis pH 6,5 fällt dann der Dissoziationsgrad fast linear ab und unterhalb von pH 5,9 liegt das oxypyrentrisulfosaure Natrium nur noch als Molekül vor (Abb. 1).

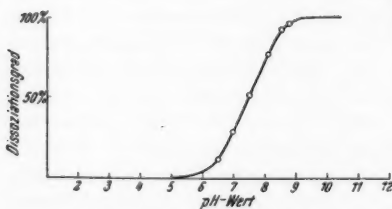


Abb. 1. 3-oxy-5-8-10-pyrentrisulfosaures Natrium. Dissoziationskurve (kolimetrisch).

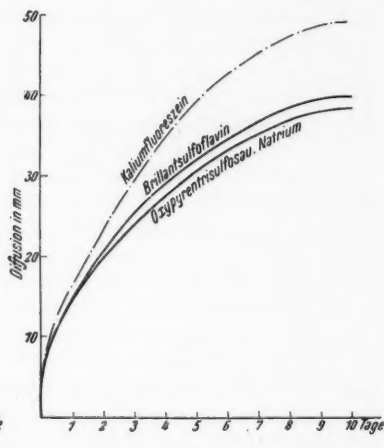


Abb. 2. Die Diffusion der Fluorochrome in 10%iger Gelatine (Kaliumfluoreszein zum Vergleich).

Die Ausschüttungsversuche mit Benzol, Toluol, Chloroform und Terpentinöl verliefen negativ und zeigten, daß alle verwendeten Fluorochrome weder in ionisiertem noch in molekularem Zustand in organischen Lösungsmitteln und damit in Lipoiden löslich waren.

Um eine vergleichbare Aussage über den Dispersitätsgrad machen zu können, wurde die Diffusionsgeschwindigkeit in 10%iger Gelatine (pH 4,5) bestimmt. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, diffundieren alle Pyrensulfo-säuren und Brillantsulfoflavin FF mit ziemlich übereinstimmender Geschwindigkeit. Wenn auch die Diffusionswerte von Kaliumfluoreszein nicht erreicht werden, sind diese Fluorochrome noch als hochdiffusibel zu bezeichnen.

Die Fluorochromierungsergebnisse

Im Gegensatz zu den bisher als speichernd erkannten Leitbündelscheiden von Laub- und Blütenblättern sowie jugendlichen Zellen dürften die oberen Epidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium Cepa*, die aus ruhenden Zwiebeln stammten, keine extremen Stoffwechselbedingungen aufweisen. Nachdem Houska (1939, 1941) innerhalb einer Zwiebelschuppe Längsgradienten im osmotischen Wert sowie Unterschiede im Permeabilitäts-

verhalten nachweisen konnte, außerdem altersmäßig bedingte physiologische Gradienten zwischen äußeren und inneren Schuppenblättern bekannt sind und angetriebene Zwiebeln sich anders anfärben lassen als in Ruhe befindliche (Drawert 1940), wurden nur die Mittelpartien der zweiten Schuppe von außen verwendet, um ein physiologisch möglichst gleichartiges Versuchsmaterial zu erlangen.

Die Fluorochromierung wurde nach der von Strugger (1935, 1949) angegebenen Methode in frisch angesetzten Phosphatpufferlösungen mit bekanntem pH-Wert vorgenommen. Die pH-Bestimmung fand mit der Platinwasserstoffelektrode eines Ionometers von Lautenschläger statt.

Da die Epidermen den Pufferlösungen relativ lange (mehr als 24 Stunden) ausgesetzt waren, mußte die Frage der schädigenden Wirkung dieser Gemische auf lebende Zellen erneut geprüft werden. Es wurden daher Epidermishäutchen nach 24- bis 48stündigem Aufenthalt in ungefärbten Pufferlösungen von verschiedenem pH-Wert mit Rohrzucker plasmolysiert und außerdem nach der Methode von Strugger (1940) mittels Akridinorange auf ihre Vitalität untersucht. Nur in den extrem sauren Stufen, die Salzsäure enthielten, waren nach 24 Stunden alle Zellen abgestorben, während in den Puffergemischen zwischen pH 4,5 und pH 10,0 alle Zellen am Leben und normal plasmolysierbar waren. Durch die Fluorochromierung mit Akridinorange konnte nachgewiesen werden, daß auch nach 48 Stunden innerhalb der angegebenen Grenzen — im mittleren pH-Bereich — alle Zellen voll am Leben waren und das bei Strugger (1940) beschriebene Bild der Fluorochromierung zeigten.

Bei abgestuften kürzeren Färbezeiten erreicht man bei Fluorochromierung mit den sulfosauren Fluorochromen nur eine Imbibition des submikroskopischen Kapillarsystems der Membranen. Eine Farbstoffbindung an die Membran hat aber nicht stattgefunden, da die imbibitierten Fluorochrome leicht wieder auswaschbar sind. Erst nach 18- bis 24stündiger Versuchszeit ist eine vitale Aufnahme und Speicherung in den Zellvakuolen nachzuweisen, die nur fluoreszenzoptisch sichtbar ist, nicht dagegen im Hellfeld. Nur abgestorbene Zellen sind zu einer starken Speicherung im Zytoplasma und in den Kernen befähigt, die im Hellfeld bereits nach 15 bis 20 Minuten als schwache Gelbfärbung, im Fluoreszenzmikroskop durch die überaus hohe Intensität eine leichte Unterscheidung toter und lebender Zellen ermöglicht.

Damit der an der Oberfläche anhaftende und der im Membransystem imbibitierte Farbstoff keine störende Überstrahlung hervorruft, war es erforderlich, die Epidermishäutchen ungefähr eine Stunde hindurch in Pufferlösungen gleichen pH-Wertes auszuwaschen.

Alle Fluorochrome wurden von den lebenden Epidermiszellen der Zwiebeln in gesetzmäßiger Abhängigkeit vom pH-Wert der Farblösung lediglich im sauren Bereich aufgenommen und in den Vakuolen diffus gespeichert. Das Zytoplasma und die Kerne lebender Zellen sind zu einer Speicherung aber nicht befähigt. Die nicht fluorochromierten Zellbestandteile, nämlich die Membran, das Zytoplasma und die Kerne, sind im Fluoreszenzmikroskop als dunkle Aussparungen gut zu erkennen. In den

langgestreckten, spitz zulaufenden Epidermiszellen sind die mit Plasma erfüllten Zwickel, bei seitenwandständiger Lage auch der Zellkern und die Plasmastränge zu beobachten, wie es Abb. 3 zeigt. Bei Dunkelfeldbeobachtung ist festzustellen, daß die Konfiguration des Plasmas unverändert erhalten geblieben ist. Die Plasmaströmung erscheint gegenüber ungefärbten Zellen etwas beschleunigt zu sein.

In der Nähe des Schnittrandes und der durch die Präparation getöteten Zellkomplexe sind gelegentlich nekrotisch geschädigte Zellen zu beobachten, die sich durch eine starke Vakuolenkontraktion und eine wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität ihrer Vakuolen von den anderen unterscheiden.

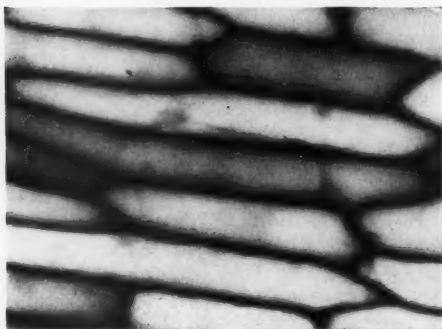


Abb. 3. Obere Epidermis einer Zwiebelsschuppe von *Allium Cepa* nach 24stündiger Fluorochromierung mit dioxypyrendisulfosaurem Natrium (pH 4,5). Die Vakuolen fluoreszieren seegrün bis eisblau, das Zytoplasma (Plasmastränge!), Kerne und Membranen sind ungefärbt.

stärkere Speicherung durch traumatisch gereizte Zellen des Schnitt- randes nie zu beobachten, wie sie von Strügger (1935) und nach ihm von anderen Autoren bei Färbung mit basischen Farbstoffen festgestellt werden konnte.

Eine reversible „physiologische Vakuolenkontraktion“ im Sinne Küsters (1940), wie sie bei Speicherung von Neutralrot, Akridinorange und anderen basischen Farbstoffen beschrieben worden ist, tritt bei Fluorochromierung mit Sulfosäuren nicht auf.

Eine Abnahme der Vakuolenfluoreszenz durch Exosmose war nach Übertragung fluorochromierter Epidermen in ungefärbte Pufferlösungen nur im sauren Bereich bis zu pH 6,0 zu beobachten, nicht aber in Leitungswasser oder alkalischen Pufferlösungen.

Nach der 24-stündigen Färbezeit sind infolge der Giftwirkung der Salzsäure in den extrem sauren Lösungen bis zu pH 3,5 alle und bis zu pH 4,5 etwa 30 bis 50% aller Zellen abgestorben. Auch bei kurzzeitigen Versuchen machen sich nekrotische Schädigungen und schließlich der Zelltod be-

Es handelt sich um eine „pathologische Vakuolenkontraktion“, verursacht durch den Wundreiz, der eine Verschiebung der aktuellen Azidität des Zellsaftes in das alkalische Gebiet zur Folge hat (Küster 1939). Bei Fluorochromierung mit den Indikatoren sind diese Zellen demnach durch eine stark laubgrüne Fluoreszenz ausgezeichnet. Zur echten Plasmolyse nicht mehr fähig, zeigen sie häufig Tonoplastenplasmolyse und sterben meist noch während der Beobachtung ab.

Mit Ausnahme dieser nekrotisch geschädigten Zellen ist aber eine allgemein

merkbar, bevor es zu einer fluoreszenzoptisch nachweisbaren intravitalen Speicherung der Zellen kommt. Von pH 4,5 ab bis weit in das alkalische Gebiet bleiben alle Epidermiszellen voll am Leben.

Oxyppyrentrisulfosaures Natrium (Tabelle 2).

Die Vakuolen der lebenden Epidermiszellen fluoreszieren von pH 3,55 ab stark diffus seegrün mit einer geringen Beimischung laubgrüner Farb-

Tab. 2. Abhängigkeit der Vakuolenfluoreszenz vom pH-Wert der Lösungen.

Versuchsobjekt: Oberepidermis der Zwiebelschuppe von *Allium Cepa*, leb.
 Färbezeit: 24 Stunden, 1 Stunde ausgewaschen,
 Intensität der Fluoreszenz: +++ = stark, ++ = schwach, + = sehr schwach,
 ± = zum Teil ungefärbt, — = keine Färbung.

pH-Farblsg. pH-Pufferl.	Oxyppyren- trisulfosaur. Natrium	Dioxyppyren- disulfosaur. Natrium	Aminopyren- trisulfosaur. Natrium	Monomethyl- aminopyren- trisulf. Na.	Acetyl- aminopyren- trisulf. Na.	Brillant- sulfollavin FF
2,40						
2,30	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3,53	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3,44						
4,86						
5,02	+++	+++	+ bis ++	+ bis ++	+	+++
5,35						
5,51	+++	++	+	+	—	+++
5,91						
5,71	+	+	—	—	—	+
6,35						
6,27	±	—	—	—	—	±
6,82						
7,20	—	—	—	—	—	—
7,54						
7,61	—	—	—	—	—	—
8,34						
8,45	—	—	—	—	—	—
10,58						
10,65	—	—	—	—	—	—

Bei pH 2,40 sind 50—100% aller Zellen abgestorben; bei pH 3,53 sind 30—50% aller Zellen abgestorben; in den übrigen Werten keine Schädigungen.

töne. Die Fluoreszenzintensität, die ein Ausdruck für die Speichergu-
 qualitäten der Zellvakuole ist, kann infolge physiologischer Unterschiede
 unbekannter Natur in den einzelnen Zellen sehr verschieden sein, wobei die
 nur schwach fluorochromierten Zellen in ihren Vakuolen vorwiegend see-
 grün und die stärker fluorochromierten intensiv laubgrün fluoreszieren.

Von pH 5,91 ab nimmt die Intensität der Vakuolenfluoreszenz gesetz-

mäßig ab, so daß bei pH 6,35 der größte Teil der Zellen ungefärbt bleibt. Von pH 6,82 ab findet aus neutralen und alkalischen Farblösungen keine Aufnahme mehr statt.

Dioxyipyrendisulfosaures Natrium (Tabelle 2).

Von pH 3,31 ab bis pH 4,5 speichern die Vakuolen das Fluorochrom mit leuchtend eisblauer bis schwach seegrüner Fluoreszenz, der mehr oder weniger auch laubgrüne Farbtöne beigemischt sind. Auch hier ist zu beobachten, daß die Fluoreszenzintensität und -farbe nicht in allen Zellen eines Epidermishäutchens gleich ist (vgl. Abb. 3). Mit zunehmendem pH-Wert sind die Zellsafträume oberhalb von pH 6,28 nicht mehr zu einer Speicherung befähigt.

Die Fluorochromierungsergebnisse der anderen Pyrensulfosäuren, die sich bezüglich der Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösungen gleichartig verhalten, sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Brillantsulfoflavin FF wird bei gleicher pH-Abhängigkeit mit auffallend hoher Intensität gespeichert. In den Vakuolen solcher Zellen, die sich durch eine besonders hohe Speicherkapazität auszeichnen, kommt es gelegentlich zur Bildung eines goldgelb fluoreszierenden Niederschlags, dessen Teilchen anfänglich in lebhafter Brownscher Bewegung sind.

Die Prüfung der Vitalität durch Plasmolyse und Fluorochromierung mit Akridinorange nach Strugger

Um die Vitalität der Fluorochromierung zu prüfen, wurden gefärbte und ungefärbte Epidermen mit dem indifferenten Rohrzucker, ferner mit KNO_3 , KCNS, KCl und CaCl_2 in 0,6-molarer Lösung einer Plasmolyse unterzogen. Es stellte sich heraus, daß die Fluorochromierung auf den Plasmolyseeintritt, ihren Verlauf und die dabei auftretenden Plasmolyseformen keinen Einfluß hat.

Bei Rohrzucker tritt zu Beginn eine konkave Abhebung des Protoplasten an den Zellenden mit großen negativen Plasmolyseorten an den Seitenwänden ein. Der Endplasmolysegrad mit völlig konvexer Abkuglung wird erst nach mehreren Stunden erreicht. Eine sekundäre Fluorochromierung des Zytoplasmas und der Kerne konnte nicht beobachtet werden.

Bei Kaliumnitrat ist ein rascher Plasmolyseeintritt mit konkaven Formen festzustellen. Nach 15 Minuten setzt eine allmähliche Abrundung ein, so daß nach 45 bis 60 Minuten die Plasmolyse perfekt ist. Eine durch die Intrabilität für Alkalisalze bedingte Aufquellung des Plasmas und der Kerne führt häufig zu einer Kappenplasmolyse (Höfler 1939). In ihrem Verlauf tritt eine Änderung in der Verteilung der Fluorochrome ein, denn das Zytoplasma und die Kerne vermögen nun in geringem Maße sulfosaure Fluorochrome zu speichern und zeigen dann eine schwache Fluoreszenz. Dies wird besonders deutlich in den Plasmabrücken zwischen zwei Teilprotoplasten, und liegt zufällig ein Kern in einer derartigen Plasmabrücke, ist auch hier die sekundäre Fluorochromierung eindeutig zu beobachten. Die bei den Fluoreszenzindikatoren auftretende Zunahme laubgrüner Farb-

töne läßt auf eine Alkalisierung des Zellsaftes auf Grund der Einwirkung der Elektrolyte schließen.

Im späteren Verlauf der Plasmolyse wurde die äußere Plasmagrenzschicht, das Plasmalemma, als distinktes Häutchen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar, wie aus Abb. 4 ersichtlich. Offenbar ist in diesem bereits nekrotischen Stadium den Fluorochromen eine stärkere Bindungsmöglichkeit gegeben als im übrigen Plasma.

Im gleichen Sinne verläuft auch die Plasmolyse mit Kaliumchlorid, während bei Kaliumrhodanid die pathologisch erhöhte Intrabilität nach einer sehr raschen Quellung und Verflüssigung des Plasmas und des Kernes zur

Kappenplasmolyse führt (Strugger 1931). Die konvexe Abkuglung erfolgt bereits nach wenigen Minuten und entsprechend der starken kolloidphysikalischen Einwirkung dieses Salzes auf das Protoplasma, ist die sekundäre Fluorochromierung von Plasma und Kern stärker als bei den übrigen Elektrolyten.

Krampfartige bis konkave Formen sind für den Plasmolyse-Eintritt bei Calciumchlorid charakteristisch. Eine konvexe Abrundung ist nach 30 Minuten eingetreten, wobei die Hechtschen Faden erhalten bleiben. Plasma und Kerne werden im Verlauf der Plasmolyse auch hier sekundär fluorochromiert, so daß sekundäre Änderungen des Speicherungsvermögens des Plasmas durch das Salz anzunehmen sind.

Bei Fluorochromierung mit Akridinorange nach Strugger (1940) zeigen die Epidermiszellen stets die typische Grünfluoreszenz des Plasmas und der Kerne, die nur voll lebensfähigen Zellen eigen ist. Die kupferrote Fluoreszenz toter Zellen oder gelbgrüne nekrotisch geschädigter Protoplasten konnte in den als lebend angesprochenen Epidermiszellen niemals festgestellt werden.

Mit Brillantsulfoflavin FF fluorochromierte Zellen zeigen nach der Behandlung mit Akridinorange in ihren Vakuolen einen rot fluoreszierenden Niederschlag, der auf eine chemische Reaktion beider Fluorochrome zurückzuführen ist, wie Fällungsreaktionen in vitro gezeigt haben. Die ursprünglich laubgrüne Fluoreszenz der Vakuole verändert sich nach der Aufnahme von Akridinorange charakteristisch nach Gelb und dann nach Rot. Gleichzeitig treten im Zellsaft leuchtend rot fluoreszierende Kristalle auf, die anfänglich in lebhafter BMB sind (vgl. Abb. 5). Plasmolysierte Zellen, in

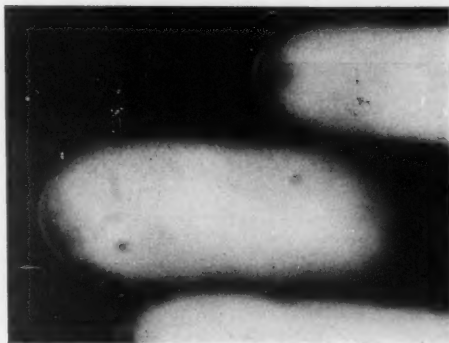


Abb. 4. Obere Epidermis einer Zwiebelschuppe von *Allium Cepa* nach 24stündiger Fluorochromierung mit dioxypyrendisulfosaurem Natrium (pH 4,5) und anschließender Plasmolyse mit KNO_3 (0,6 mol). Elektive Fluorochromierung des Plasmalemmas.

denen bereits eine sekundäre Aufnahme von Brillantsulfoflavin FF im Zytoplasma erfolgt ist, lassen nach Färbung mit Akridinorange auch dort vereinzelte Kristalle einwandfrei erkennen. Eine sichere Feststellung im Zellkern war dagegen technisch nicht möglich.

Die Fluorochromierung alkoholfixierter Epidermen

Von dem Gedanken ausgehend, daß eine kurze Fixierung mit 70%igem Alkohol nur eine Dehydratisierung der Biokolloide bewirkt, die elektrische Ladung bei kurzzeitigen Versuchen aber nicht ändert (Pischinger 1926,

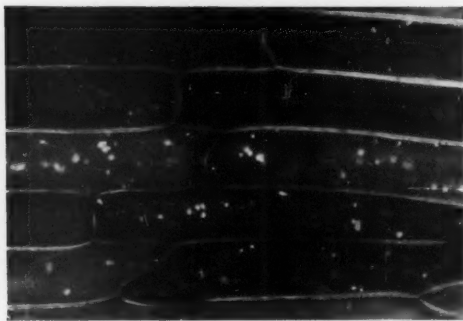


Abb. 5. Obere Epidermis einer Zwiebelschuppe von *Allium Cepa* nach 24stündiger Fluorochromierung mit Brillantsulfoflavin FF (pH 6,2) und anschließender Färbung mit Akridinorange. In den Vakuolen ein rot fluoreszierender Niederschlag.

1927; Naylor 1926; Drawert 1937), wurden abschließend Reihenfärbungen mit pH-abgestuften Lösungen der Fluorochrome durchgeführt. Alle Fluorochrome wurden nach 15 bis 20 Minuten dauernder Färbezeit nur im sauren pH-Bereich bis zu pH 5,3 im Zytoplasma und in den Kernen gespeichert, nicht dagegen im neutralen und alkalischen. Wie aus

Tabelle 3 hervorgeht, ist die Fluoreszenzintensität in den extrem sauren Lösungen am stärksten und nimmt dann kontinuierlich bis zu dem obig erwähnten pH-Wert ab. Die Fluoreszenzfarbe entsprach der Fluoreszenzfarbe der Anionen mit einer nur geringen Beimischung seegrüner, bzw. eisblauer Farbtöne bei den beiden Fluoreszenzindikatoren.

Besprechung der Ergebnisse

Nachdem der sichere Nachweis einer Aufnahme und Speicherung sulfonsaurer Farbstoffe bisher nur an Pflanzenzellen mit besonders hoher physiologischer Aktivität erbracht werden konnte (Collander 1921; Drawert 1941), beweisen die hier vorliegenden Ergebnisse, daß auch lebende Zellen ohne besondere „physiologische Potenzen“ zu einer Aufnahme von Sulfosäuren in der Lage sind und sie — allerdings wesentlich langsamer als basische Farbstoffe — sogar zu speichern vermögen. Die Epidermiszellen der Schuppenblätter ruhender Küchenzwiebeln sind „normale“ Zellen, in denen weder extreme Stoffwechselbedingungen herrschen noch Gerbstoffe und andere die Speicherung von Farbstoffen beeinflussende Inhaltsstoffe (Lipoide und Fettsäuren) sonderlich in Erscheinung treten.

In Übereinstimmung zu den Ergebnissen Collanders (1921) und anderer Autoren sind die Fluorochrome nur in den Vakuolen gespeichert worden, nicht aber im Plasma oder in den Kernen lebender, ungeschädigter

Zellen. Die erforderlichen langen Versuchszeiten sind ebenfalls aus der Literatur seit Pfeffer (1886) bekannt. Damit verhalten sich die sulfosauren Farbstoffe ganz anders als die basischen, welche von lebenden Zellen außerordentlich schnell aufgenommen und gespeichert werden, so daß be-

Tab. 3. Abhängigkeit der Plasma- und Kernfluoreszenz vom pH-Wert der Lösungen bei *Allium*-Epidermen, die mit 70%igen Alkohol fixiert waren.

Versuchsobjekt: Oberepidermis von *Allium Cepa*-Zwiebelschuppen,
 Fixation: 20 Minuten mit 70%igem Alkohol, kurz ausgewaschen,
 Färbezeit: 20 Minuten, kurz ausgewaschen,
 Intensität der Fluoreszenz: +++ = stark, ++ = schwach, + = sehr schwach,
 ± = zum Teil ungefärbt, — = keine Färbung.

pH-Farblsg. pH-Pufferl.	Oxypyren- trisulfosaures Natrium	Dioxypyren- disulfosaures Natrium	Aminopyren- trisulfosaures Natrium	Monomethyl- aminopyren- trisulfos. Na.	Acetyl- aminopyren- trisulfos. Na.	Brillant- sulfosflavin FF
2,50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2,35	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3,60	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3,75	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4,26	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4,63	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4,97	++	++	++	++	++	+++
4,86	++	++	++	++	++	++
5,15	++	++	++	++	++	++
5,35	++	+	+	+	+	++
5,32	++	+	+	+	+	++
5,40	+	+	+	+	+	+
5,80	—	—	—	—	—	—
5,94	—	—	—	—	—	—
6,45	—	—	—	—	—	—
6,78	—	—	—	—	—	—
7,34	—	—	—	—	—	—
7,58	—	—	—	—	—	—
8,65	—	—	—	—	—	—
8,95	—	—	—	—	—	—
9,68	—	—	—	—	—	—
9,87	—	—	—	—	—	—

reits nach fünf Minuten dauernder Färbezeit ein optischer Nachweis im Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskop möglich ist. Sulfosäuren gleicher Dispersität können erst nach 24-stündiger Versuchszeit nachgewiesen werden und auch dann nur als Fluorochrome, nicht dagegen als Diachrome.

Daß es sich wirklich um eine Speicherung, um eine Aufnahme über den Konzentrationsausgleich hinaus handelt, zeigt der Vergleich der Fluoreszenzintensität der mit Sulfosäuren fluorochromierten Epidermiszellen mit einer ungefähr gleichdicken Schicht der zur Anwendung gebrachten Lösung

des betreffenden Fluorochroms. Die Zellsafträume zeigen stets eine höhere Fluoreszenzintensität als die Farblösung. Die von Collander und Virtanen (1938) vertretene Ansicht von der hochgradigen Impermeabilität der Plasmahäute für Sulfosäurefarbstoffe muß damit fallen gelassen werden.

Die Ursache für das bisher beobachtete nicht unbeträchtliche Speichervermögen bestimmter Zellen und Gewebe sieht Collander in der diesen Zellen eigenen „adenoiden Tätigkeit“ ihrer Protoplasten, ohne diesen von Overton geprägten Begriff physiologisch erklären zu können. Er spricht dies einleitend in seiner Arbeit (1942) wie folgt aus: „Über den Mechanismus der adenoiden Ionenaufnahme ist bisher außerordentlich wenig mit Sicherheit bekannt. Ihre Abhängigkeit von der Atmung, ihre Empfindlichkeit für Narcotica sowie der Parallelismus zwischen Salzaufnahme und Eiweißsynthese können zwar als Fingerzeige bezüglich der wahrscheinlichen Art dieses Mechanismus gelten. Sehr nahe liegt es natürlich auch, eine Beteiligung von elektrischen Kräften bei der aktiven Ionenaufnahme anzunehmen.“ — Physiologisch nicht ausgezeichneten Zellen soll diese „Adenoidie“ ihrer Protoplasten fehlen und damit die Möglichkeit der Aufnahme sulfosaurer Farbstoffe.

Sofern methodisch kein Zweifel darüber besteht, daß physiologisch „normale“ Zellen in der Tat nicht zu einer intravitalen Aufnahme und Speicherung von Sulfosäuren befähigt sind, müßte dieses rätselhafte Verhalten morphologisch oft nur wenig sich unterscheidender Zellen in uns unbekannten Eigenschaften der lebenden Substanz begründet sein. In dieser Arbeit kann aber gezeigt werden, daß auch diese Zellen zu einer allerdings geringen Speicherung in der Lage sind, die nur mit sehr empfindlichen Methoden erfaßt werden kann. Bei den bisher untersuchten Diachromen hat sich die sicher vorhandene Aufnahme auf Grund der geringen Nachweisempfindlichkeit dem optischen Nachweis entzogen.

Die bisher beobachtete „Nichtaufnahme“ kann aber auch in anderen nicht berücksichtigten Faktoren ihre Ursache haben. Collander und Virtanen (1938) vergleichen verdünnte Farblösungen von Cyanol und Orange G mit dem Farbwert des Zellsaftes von *Tolypellopsis*-Internodialzellen, die 6 bis 24 Stunden gefärbt waren. Die negativen Befunde führten zu dem Schluß, daß der Protoplast für die beiden Diachrome weitgehend undurchlässig ist. Dies muß aber aus verschiedenen Gründen abgelehnt werden, denn der Zellsaft der Characeen ist nach Untersuchungen Collanders (1930) außerordentlich arm an Kolloiden, die für eine Speicherung aber von großer Bedeutung sind. Bei *Chara ceratophylla* wurde ein Trockensubstanzgehalt von 1,8% gefunden, wovon der größere Teil aus nicht kolloiden anorganischen Salzen besteht. Der Zellsaft von *Tolypellopsis* ist zwar reicher an organischer Substanz aber die geringe Viskosität spricht nach Collander und Virtanen (1938) für einen nur mäßigen Gehalt an Kolloiden. So sind die Characeen für solche Untersuchungen ein ungeeignetes Objekt und auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse muß angenommen werden, daß die „Nichtaufnahme“ bei *Tolypel-*

lopsi zum Teil auf die geringen Speicherungsmöglichkeiten dieser Zellen zurückzuführen ist.

Eine weitere Ursache liegt in der Nichtberücksichtigung des Dissoziationsverhaltens der beiden Diachrome. Nach Drawert (1941) wandern sie in der Kataphorese bei allen untersuchten pH-Werten mit großen Steighöhen zur Anode. Sie müssen demnach bis weit in das saure Gebiet hinein dissoziiert sein, und auch in den Lösungen Collanders und Virtanens (pH 5,4 und pH 6,0) können vorwiegend nur Farbanionen im Außenmedium vorgelegen haben. Auf Grund der eigenen Befunde vermögen Sulfosäuren nachweisbar nur als Moleküle zu permeieren, die Permeation der Ionen tritt dagegen sehr stark zurück und führt nicht zu einer optisch erkennbaren Aufnahme. Da das Speichungsvermögen von *Tolypellopsi* dazu sehr gering ist, kann es nicht verwundern, daß nach 24 Stunden selbst das Diffusionsgleichgewicht noch nicht eingetreten ist. Trotz dieser sehr ungünstigen Bedingungen muß aber eine sehr langsame Aufnahme erfolgt sein, was aus dem kolorimetrischen Vergleich der mit *Tolypellopsi* beschickten Versuchslösung von Orange G und der Kontrolllösung hervorgeht, der von den Autoren nach einem sechs Tage dauerndem Versuch durchgeführt wurde.

Da die Diffusibilität der beiden Diachrome nach Drawert (1941) sehr hoch ist, dürfte die Teilchengröße im Vergleich zu den hier verwendeten Fluorochromen kein hemmender Faktor gewesen sein.

Der Vergleich der verwendeten Konzentrationen zeigt den Vorteil, den die Fluorochrome gegenüber den Diachromen bieten. Collander und Virtanen waren gezwungen mit 3%igen bzw. 0,2%igen Lösungen zu arbeiten. In den eigenen Untersuchungen konnte bereits mit 0,01%igen Lösungen ein ausreichender vitaler Färbefeffekt erzielt werden. Außerdem war es möglich, stärker saurere Lösungen zu verwenden, was für die Deutung der Speicherungsmechanik von wesentlicher Bedeutung war.

Da seitens Collanders (1921) der Einwand gemacht worden ist, daß Zellen mit fehlender Adenoidie erst nach Schädigung zu einer Aufnahme von Sulfosäuren befähigt sein sollen, wurde in dieser Arbeit streng darauf geachtet, daß nur die Fluorochromierung voll lebender Zellen beurteilt wurde. Im Hinblick auf die langen Färbezeiten soll darum die Frage nach der Einwirkung der Puffersubstanzen und der Fluorochrome auf den Lebenszustand der Zelle, wie auf nekrotische Veränderungen der Plasmastruktur und die mögliche Beeinflussung der aktuellen Azidität im Zellsaft zuerst diskutiert werden.

Die Fluorochromierung mit den Pyrensulfosäuren und Brillantsulfoflavin FF muß nach Strugger (1937) als inturbante Vitalfluorochromierung bezeichnet werden. Die ersten Schädigungen sind frühestens nach 48 Stunden in vereinzelter Zellen zu beobachten und erst nach mehreren Tagen sterben die Epidermishäutchen ab.

Durch die Puffersubstanzen wird in kurzen, 10 Minuten langen Versuchszeiten der Plasmazustand und die Azidität des Zellsaftes nicht geändert, wie Strugger (1940, 1941) feststellen konnte. Nach 24- und 48stündigem Aufenthalt in gepufferten Lösungen zeigen die *Allium-Epi-*

dermiszellen nur in den extrem sauren und extrem alkalischen Stufen Änderungen ihrer Plasmastruktur, die bei ersteren sehr bald zum Absterben der Zellen führen; über Änderungen der Plasmastruktur in stark alkalischen Puffern (pH 11,5) berichtet Strugger (1941). Im mittleren vitalen pH-Bereich zwischen pH 4,5 und pH 9,5 sind keinerlei Schädigungen aufgetreten. Es sind die Epidermiszellen in der Lage, sich dem Aziditätsgrad des Außenmediums physiologisch anzupassen, ohne daß die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wird. Die Kritik Collanders kann daher für diese Untersuchungen nicht zutreffen.

In diesem Zusammenhang interessiert auch die Frage nach dem pH-Wert des Zellsaftes in lebenden, ungeschädigten und in nekrotisch veränderten Zellen. Mit basischen Indikatoren kann nur mit Vorbehalt auf den aktuellen Aziditätsgrad geschlossen werden, da die Tatsache der Lösungsmetachromasie in dem lipoiden System eine kolorimetrische Beurteilung innerhalb der Zelle unmöglich macht. Die hier verwendeten sulfosauren Indikatoren werden dagegen nur im hydroiden System des Zellsaftes gespeichert, da sie weder zu den Lipoiden noch zu Gerbstoffen eine besondere Affinität aufweisen. In dem Versuchsmaterial waren die Schwankungen des pH-Wertes zwischen pH 4,5 und pH 6,5 besonders auffällig, da es sich um morphologisch sehr gleichartige Zellen handelt. Die Ursache dürfte wahrscheinlich in dem jeweiligen stoffwechselphysiologischen Zustand der Zelle zu suchen sein. Bei Übertragung vorgefärbter Epidermen in schwach alkalische Pufferlösungen konnte keine Änderung der Vakuolenfluoreszenz festgestellt werden. Eine starke Alkalisierung des Außenmediums durch eine sehr verdünnte Ammoniaklösung ($1/200$ N) vermag die Zelle nicht zu ertragen. Binnen kurzer Zeit erfolgt auf Grund der raschen Permeation des Ammoniaks ein Farbumschlag nach Laubgrün und bald darauf das Absterben. Eine irreversible Verschiebung des pH-Wertes in das alkalische Gebiet konnte ebenfalls bei traumatischen Schädigungen und beginnenden Nekrosen beobachtet werden.

Für eine Analyse der Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch lebende Zellen ist nun die Frage nach der Ursache der langsamen Aufnahme im Vergleich zu der raschen von basischen Farbstoffen von größter Bedeutung. Die lipoidunlöslichen Sulfosäuren können nur durch die submikroskopischen Poren der Plasmagrenzschichten permeieren und es muß festgestellt werden, ob die Ursache für die geringe Aufnahmegeschwindigkeit in der Permeabilität zu suchen ist oder ob das Speicherungsvermögen der Zelle damit in einem kausalen Zusammenhang steht.

Ebenso wie basische Farbstoffe in gesetzmäßiger Abhängigkeit vom pH-Wert des Außenmediums aufgenommen werden, ist auch eine entsprechende Beziehung für saure bekannt. Wie Strugger (1938) zeigen konnte, wird Kaliumfluoreszein in strenger Gesetzmäßigkeit nur bei saurer Reaktion der Lösungen in der Zelle gespeichert. Für die hier untersuchten Sulfosäuren trifft dies ebenfalls zu. Die *Allium*-Epidermiszellen vermögen nur aus sauren Lösungen, in denen die Sulfosäuren undissoziiert bzw. weitgehend in molekularer Form vorliegen, diese aufzunehmen, nicht dagegen aus solchen, in denen sie als Ionen vorhanden sind. In der Tabelle 4 ist

die Grenze der Aufnahme in die Vakuolen in Beziehung zum Dissoziationsbereich der betreffenden Fluorochrome gesetzt. Liegen die Sulfosäuren bis zum Neutralpunkt vorwiegend undissoziiert vor, liegt die Grenze der Aufnahme zwischen pH 5,8 und pH 6,5. Einige Pyrensulfo Säuren sind aber bereits im sauren Gebiet stärker dissoziiert. In diesem Falle verschiebt sich der Grenzwert ebenfalls in das saure Gebiet, so daß eine Fluorochromierung nur bis zu pH 4,2 und pH 4,6 zu beobachten ist. In erster Linie vermögen also die Moleküle zu permeieren, für Ionen kann der optische Nachweis der Permeation nicht erbracht werden. Damit werden die Angaben Collanders (1942) über die mangelnde Permeationsfähigkeit von Anionen bestätigt.

Tab. 4. Abhängigkeit der Speicherung von der Dissoziation.

Fluorochrom	Grenze der Vakuolenaufnahme bei pH	Kritischer Dissoziationsbereich (pH-Wert)
<i>Brillantsulfoflavin FF</i>	6,50	6,0—9,5
<i>Oxyppyrentrisulfosaures Natrium</i> . . .	5,90	5,9—8,8
<i>Dioxyppyrendisulfosaures Natrium</i> . . .	5,80	5,6—8,5
<i>Aminopyrentrisulfosaures Natrium</i> . .	4,60	4,0—6,0
<i>Monomethylaminopyrentrisulfosaures Natrium</i>	4,60	4,0—6,0
<i>Acetylaminopyrentrisulfosaures Natrium</i>	4,20	3,5—5,0

Es ist demnach verständlich, daß eine vitale Anfärbung mit den nur im stark sauren pH-Bereich molekular vorliegenden Sulfosäuren nicht erzielt werden konnte, da in den extrem sauren Lösungen, wo die physikochemischen Aufnahmebedingungen am günstigsten wären, eine intravitale Aufnahme nicht stattfinden kann, weil sehr bald eine Schädigung der Zellen und schließlich der Tod eintritt.

Auch die Teilchengröße der Farbstoffe könnte einen wesentlichen Einfluß auf das Permeationsvermögen und damit auf die langsame Aufnahme haben. Nach den Diffusionsversuchen sind die Fluorochrome hochdiffusibel und müssen demnach die gleiche Dispersität besitzen wie basische Farbstoffe mit gleicher Diffusionsgeschwindigkeit. Wenn trotzdem beide Farbstofftypen mit so unterschiedlicher Geschwindigkeit aufgenommen werden, ist daraus zu schließen, daß bei den feindispersen Farbstoffen die Dispersität keinen Einfluß hat, sofern eine gewisse Teilchengröße, die in Beziehung zur Porenweite der Plasmagrenzschichten in der untersuchten Zelle steht, unterschritten ist.

Viel wichtiger scheint aber die völlige Lipoidunlöslichkeit der Sulfosäuren zu sein. Nach Drawert (1940) ist die Lipoidlöslichkeit basischer Farbstoffe nicht für ihr Permeationsvermögen maßgeblich, sondern ein ausschlaggebender Faktor für ihre Speicherung durch die Zelle. Aus dem Verhalten der Sulfosäuren muß gefolgert werden, daß ihre völlige Lipoidunlöslichkeit auch für die Permeabilität von Bedeutung ist. Jugendliche, stark wachsende Zellen der Streckungs- und Meristemzone von *Helodea*

Blättchen vermögen sulfosaure Fluorochrome mit großer Intensität zu speichern (Perner 1949). Wenn aber trotzdem der Aufnahmevorgang mit der gleichen Geschwindigkeit abläuft wie in den nur wenig speichernden *Allium*-Epidermiszellen, kann mit Sicherheit angenommen werden, daß der hemmende Faktor in der Permeabilität zu suchen ist.

Somit muß der Aufbau der die Permeabilität regelnden Plasmagrenzschichten im Zusammenhang mit der Lipoidunlöslichkeit der Sulfosäuren für ihre langsame Aufnahme entscheidend sein. Collander und Virtanen (1938) sprechen dies einleitend in ihrer Arbeit aus: „Ob die lebenden Protoplasten durchlässig oder undurchlässig für Sulfosäurefarbstoffe sind, kann nicht gleichgültig sein, wenn wir uns eine Vorstellung von dem Bau der Plasmahäute zu bilden versuchen. Denn zweifellos müßte eine Plasmahaut, die für die großen, lipoidunlöslichen Anionen (und Moleküle) der Sulfosäurefarbstoffe leicht permeabel wäre, ganz anders beschaffen sein als eine für diese Farbstoffe undurchlässige Plasmahaut.“

Collander (1937) nimmt nun einen einheitlichen Aufbau der Plasmagrenzschichten aus polar geordneten Zell-Lipoiden an und ist der Ansicht, daß die von Bungenberg de Jong und Bonner (1935) studierten Phosphatiddoppelschichten in erster Linie als Modell der Plasmahäute in Frage kämen. Den großen und mittelgroßen Molekülen lipoidlöslicher Stoffe steht der Weg durch Diasolyse in den Plasmahautlipoiden offen, kleine Moleküle solcher Stoffe können außerdem noch in den zwischen den geordneten Lipoidmolekülen liegenden Poren permeieren, so daß sie eine höhere Permeationsgeschwindigkeit zeigen als ihrer relativen Lipoidlöslichkeit zukommt.

Es erscheint aber unwahrscheinlich, daß die völlig lipoidunlöslichen Moleküle der Sulfosäuren in gleicher Weise permeieren. Außerdem sprechen physikochemische Untersuchungen für einen heterogenen Aufbau der Grenzschichten, daß neben den Lipoiden auch Eiweißkörper beteiligt sind, welche für die Porenbildung ausschlaggebend sind (Frey-Wyssling 1938). Strugger (1940) gelang der optische Nachweis des Plasmalemmas bei Plasmolysestudien mit Kaliumrhodanid an mit Akridinorange fluorchromierten *Allium*-Epidermiszellen. Wenn das Plasmalemma sich dabei durch eine spezifische Rotfluoreszenz vom übrigen Plasma deutlich unterscheidet, muß nach der theoretischen Deutung der Färbung auf das Vorhandensein von Eiweißkörpern geschlossen werden, an die eine elektroadsorptive Bindung der Farbkationen erfolgen konnte. Auch mit sulfosauren Fluorochromen behandelte Epidermiszellen zeigen nach Plasmolyse mit Elektrolyten eine stark fluoreszierende distinkte Grenzschicht, die sich deutlich vom übrigen Plasma abhebt (vgl. Fig. 4). Auch in diesem Falle können nur Plasma-Eiweißkörper für den Effekt verantwortlich sein. Zelloberflächen besitzen ferner eine Elastizität, die nach Modellversuchen nur von Oberflächen proteinhaltiger Lösungen erreicht werden, während Lezithin- und Öltröpfchen in lebenden Zellen keine Oberflächenelastizität besitzen. Dieses wird von Frey-Wyssling betont, der in den äußeren Grenzschichten eine dichtere Lagerung von Eiweißketten in submikroskopischen Dimensionen annimmt.

So muß neben einer lipoiden Phase, die nach der Lipoidfiltertheorie für die fettlöslichen Stoffe permeabel ist, in den Plasmagrenzschichten auch eine hydroide Phase angenommen werden, deren Poren im Sinne eines Ultrafilters für feindisperse lipoidunlösliche Substanzen durchlässig sind. Aus der langsamen Aufnahme dieser Stoffe muß geschlossen werden, daß die hydroide Phase wahrscheinlich nur einen geringen Anteil am Aufbau der Grenzschichten hat.

Es bleibt nun die Frage zu klären, an welches System der lebenden Zelle die Bindung der sulfosauren Fluorochrome erfolgt. Bereits Collander (1921) und Drawert (1941) machten die Feststellung, daß die mit sulfosauren Farbstoffen behandelten Zellen lange am Leben blieben und schlossen daraus, daß eine Bindung an lebensunwichtige Strukturen der Zelle erfolgt sein müsse. Auf Grund der mangelnden Exosmose dieser Farbstoffe bei Übertragung in Leitungswasser nahmen sie eine relativ feste Bindung an. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß das Außenmedium auch für die Exosmose eine Rolle spielt, denn bei Übertragung fluorochromierter Epidermen in saure Pufferlösungen (pH 4,5) findet der langsamen Aufnahme entsprechend auch eine langsame Exosmose bis zur völligen Entfärbung statt. Eine feste irreversible Bindung kann daher nicht vorgelegen haben.

Drawert (1941) erklärt die Bindung der Sulfosäuren durch unbekannte Zwischenprodukte des Stoffwechsels, die im Verlauf intensiver Atmungs Vorgänge von bestimmten Plasmakomponenten gebildet werden und die zu den sauren Farbstoffen eine gesteigerte Affinität besitzen. Die Reaktionsprodukte werden aus dem physiologischen Geschehen ausgeschaltet und in den Vakuolen als unschädliche Schlacken deponiert. Die Entstehungs- und Abbaugeschwindigkeit dieser unbekannten Zwischenkörper soll nach Drawert der entscheidende Faktor für die Aufnahmegeschwindigkeit saurer Farbstoffe sein.

Wenn aber das Plasma so aktiv an dem Aufnahmeprozess beteiligt wäre, müßte bei der hohen Nachweisempfindlichkeit der hier verwendeten Fluorochrome wenigstens gelegentlich eine Fluoreszenz des Zytoplasmas zu beobachten gewesen sein. Dies war aber niemals der Fall, selbst nicht in den sehr aktiv speichernden jugendlichen Zellen von *Helodea* (Perner 1949).

Nach Strugger (1937) ist eine Speicherung von Farbstoffen theoretisch folgendermaßen denkbar:

1. Durch chemische Bindung im Sinne der Farblackbildung basischer Farbstoffe mit Gerbstoffen.

2. Durch physikalische Bindung

a) infolge einer gesteigerten Löslichkeitsaffinität zu bestimmten Inhaltsstoffen (Lipoide, Fettsäuren),

b) infolge einer Elektroadsorption von Farbstoffionen an positiv oder negativ aufgeladene Zellkolloide.

Gegen eine chemische Bindung spricht einmal die Tatsache der pH-Abhängigkeit der Aufnahme, ferner ist die dann anzunehmende festere Bindung

nicht vorhanden. Die sulfosauren Indikatoren zeigen nach Alkalisierung des Außenmediums mit Ammoniak in den Vakuolen sofort den Farbumschlag nach Laubgrün, der bei einer chemischen Bindung nicht zu erwarten wäre. Weiterhin reagiert Brillantsulfoflavin FF mit Akridinorange in vitro wie auch in vivo unter Bildung eines fluoreszierenden Niederschlags, was nur bei einer lockeren Bindung der Fluorochrome denkbar ist. Die mangelnde Exosmose bei Übertragung fluorochromierter Epidermen in Leitungswasser ist wohl so zu erklären, daß bei schwach alkalischem Außenmedium das Verteilungsgleichgewicht zu Gunsten der Zelle verschoben ist, wobei das Plasma als Ionenfalle das Exosmieren des Farbstoffes verhindert.

Eine Löslichkeitsspeicherung an Lipide ist wegen der Unlöslichkeit der Sulfosäuren in derartigen Systemen von vornherein auszuschließen.

Durch die Annahme einer elektroadsorptiven Bindung der sekundär dissoziierten Farbanionen an positiv aufgeladene Biokolloide können am ehesten die Beobachtungen erklärt werden. Da alle Fluorochrome nur in den Zellsaftträumen gespeichert werden, muß die Frage erörtert werden, ob die im Zellsaft vorhandenen Biokolloide überhaupt für eine Farbstoffbindung im genannten Sinne in Frage kommen.

In ausgewachsenen Dauerzellen, wie sie in den *Allium*-Epidermen vorliegen, ist der Zellsaft eine vorwiegend wässrige Flüssigkeit, deren Gehalt an Kolloiden im Vergleich zum Zytoplasma gering ist. Außerdem sind Lipide vorhanden, die für die Speicherung basischer Farbstoffe von Bedeutung sein dürften.

Die von Collander und seiner Schule untersuchten Internodialzellen der Characeen, deren Zellsaft isoliert und quantitativ analysiert werden kann, sind das extreme Beispiel eines außerordentlich kolloidarmen Zellsaftes. Außer 98% Wasser sind nur ½% organische Verbindungen und 1½% anorganische Salze im Zellsaft enthalten. Bei höheren Pflanzen, wo eine Isolierung des Zellsaftes nicht durchführbar ist, muß auf Grund von Viskositätsmessungen auf einen wesentlich größeren Gehalt an kolloiden Bestandteilen geschlossen werden. Weber (1921) und Pekarek (1930, 1931) fanden bei *Allium*-Epidermiszellen eine doppelt so große Viskosität wie bei Wasser oder wässrigen Lösungen vom Salzgehalt der Vakuolen. Durch Messungen der Fallgeschwindigkeit der Gipskriställchen in den Endvakuolen von *Closterium* fand Frey (1926) eine relative Viskosität von 2,5 (Wasser = 1). Das Extrem eines ausgesprochen kolloidreichen Zellsaftes finden wir in den Blütenblättern der Boraginaceen, wo es sogar zu einer Gelatinierung der Zellsaftkolloide kommen kann.

Im Gegensatz zum Zytoplasma ist der Zellsaft gekennzeichnet durch die Reaktionsbereitschaft seiner Kolloide, die als Sole strukturlos im Zellsaft verteilt sind. Die für Reaktionen in Frage kommenden Endgruppen sind hier nicht abgeschirmt wie im Zytoplasma. Die hohe Leitfähigkeit des Zellsaftes ist durch das Vorhandensein freier Ionen zu erklären, während der hohe Widerstand des Zytoplasmas auf das Gegenteil schließen läßt (Frey-Wyssling 1938). Die bevorzugte Speicherung basischer Farbstoffe in den Vakuolen (Strugger 1940; Drawert 1940) muß zum Teil auf das Überwiegen saurer Endgruppen (Fettsäuren) zurückzuführen sein, die geringe

Speicherungsfähigkeit für saure Farbstoffe läßt demnach auf relativ wenige basische Endgruppen schließen.

Wenn die Vakuolen ruhender *Allium*-Epidermiszellen bei dem hier verwendeten Versuchsmaterial oberhalb von pH 5,8 bis pH 6,5 nicht mehr zu einer Speicherung befähigt sind, obwohl bei einigen Fluorochromen im Außenmedium noch permeationsfähige Moleküle vorhanden sind, müssen die für eine Bindung in Frage kommenden Zellsaftkolloide jetzt nicht mehr elektropositiv aufgeladen sein. Der isoelektrische Punkt (IEP_M) dieser Kolloide muß oberhalb von pH 5,8 bis pH 6,5 überschritten sein, so daß sie jetzt elektronegativ aufgeladen und nur noch zu einer Speicherung von Farbkationen befähigt sind. So wird zum Beispiel Neutralrot und Akridinorange von ähnlichem Zwiebelmaterial nur oberhalb von pH 6,5 bis 7,0 in den Vakuolen gespeichert (Strugger 1936, 1940; Drawert 1940).

Die Mechanik des Aufnahme- und Speichervorganges wäre wie folgt denkbar: Sofern im Außenmedium permeationsfähige Moleküle feindisperser sulfosaurer Fluorochrome vorhanden sind, was meist nur in den stärker sauren Lösungen der Fall ist, können diese innerhalb der hydroiden Phase langsam in die Zelle diffundieren. Das Diffusionsgleichgewicht ist erst nach längerer Versuchszeit zu erwarten. Teilt man die Vakuolen nach ihren Inhaltsstoffen in vorwiegend wässrige bis kolloide, fettsäurereiche und gerbstoffhaltige ein, können nur die ersteren Sulfosäuren speichern, sofern die elektrostatischen Verhältnisse eine Bindung möglich machen. Basische Farbstoffe können dagegen von allen Typen gespeichert werden.

Ist der Zellsaft vorwiegend wässrig und nur durch einen sehr geringen Kolloidgehalt ausgezeichnet, wird eine Speicherung kaum zu beobachten sein. Dieser Fall ist bei den Internodialzellen von *Tolypellopsis* gegeben und die negativen Ergebnisse Collanders und Virtanens finden darin ihre Erklärung. Die Vakuolen der *Allium*-Epidermiszellen müssen dagegen reicher an Zellkolloiden sein, so daß bereits ein fluoreszenzoptischer Nachweis einer Speicherung möglich ist. Die Zellen der Leitbündelscheiben von Blüten- und Laubblättern haben so günstige Verhältnisse, daß eine Speicherung auch im Hellfeld nachweisbar ist. Außer dem Gehalt an Kolloiden ist natürlich das Maß der elektropositiven Aufladung von entscheidender Bedeutung für die Intensität der Färbung.

Die von Collander und Holmström (1937) beobachtete stärkere Aufnahme von Sulfosäuren bei Anwesenheit von Sauerstoff wäre im Sinne der hier angenommenen Mechanik der Speicherung so zu erklären, daß durch die Intensivierung der Atmungs- und Stoffwechselprozesse das Maß der elektropositiven Aufladung größer geworden sein dürfte.

Wenn im Eiweißgerüst des Zytoplasmas und der Kerne eine Speicherung der relativ großen Anionen der Sulfosäurefarbstoffe nicht erfolgt, muß neben den Ladungsverhältnissen der Eiweißkörper wahrscheinlich auch der sterische Aufbau des Plasma-Eiweißgerüsts eine Bindung nicht ermöglichen. Erst wenn durch eine mehr oder weniger starke nekrotische Einwirkung von Elektrolyten eine räumliche Auflockerung und vielleicht auch eine Ladungsänderung erfolgt ist, kann es auch dort zu einer Speicherung von Sulfosäuren kommen.

Weitere Untersuchungen sind geplant, die Aufnahme und Speicherung saurer und basischer Fluorochrome durch pflanzliche Zellen unter gesetzmäßig variierten Versuchsbedingungen experimentell zu erforschen, um die wahrscheinlichen Zusammenhänge zwischen Speicherung und Stoffwechselvorgängen analysieren zu können.

Zusammenfassung

1. Die Analyse der intravitalen Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch die lebenden oberen Epidermiszellen der Zwiebel-schuppenblätter von *Allium Cepa* ermöglichte es, die Frage, ob der pflanzliche Protoplast physiologisch nicht ausgezeichneter Zellen für Sulfosäuren permeabel oder impermeabel ist, im ersteren Sinne zu entscheiden.

Die feindispersen, durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit ausgezeichneten Pyrensulfosäuren und Brillantsulfoflavin FF vermögen nur als Moleküle zu permeieren, während für ihre Ionen die „hochgradige Impermeabilität pflanzlicher Protoplasten“ bestätigt werden konnte. Deshalb tritt bei den bis in das stark saure Gebiet hinein dissoziierten sulfosauren Farbstoffen die Permeabilität als begrenzender Faktor einer vitalen Aufnahme und Speicherung in Erscheinung.

2. Die im Vergleich zu basischen Farbstoffen gleicher Dispersität sehr langsame Aufnahme von Sulfosäuren hat ihre Ursache in erster Linie in der Struktur der Plasmagrenzschichten. Es wird ein heterogener Aufbau des Plasmalemmas aus einer lipoiden Phase (Phosphatide) und einer hydroiden (Eiweißkörper) angenommen.

Die lipoidunlöslichen Moleküle der Sulfosäuren vermögen nur durch die Poren der hydroiden Eiweiß-Komponente im Sinne der Ruhland'schen Ultrafiltertheorie zu permeieren, die lipoidlöslichen basischen Farbstoffe dagegen außerdem noch durch Diasolyse im Bereich der lipoiden Phase.

3. Die Speicherung sulfosaurer Fluorochrome in lebenden Pflanzenzellen erfolgt durch Elektroadsorption sekundär dissoziierter Farbanionen an die nur unterhalb ihres isoelektrischen Punktes (IEP_M) positiv aufgeladenen Biokolloide des Zellsaftes (IEP_M bei *Allium*-Epidermiszellen bei pH 5,8 bis pH 6,5). Für die erst im neutralen bzw. schwach alkalischen pH-Bereich dissoziiert vorliegenden Sulfosäuren ist darum die Speicherungsfähigkeit der Zelle der begrenzende Faktor einer Vitalfärbung.

Die Möglichkeit einer Löslichkeitsspeicherung durch Lipide und einer chemischen Bindung durch besondere Inhaltsstoffe wird diskutiert und muß auf Grund der experimentellen Tatsachen abgelehnt werden.

4. Für den optischen Nachweis der Aufnahme und Speicherung der Sulfosäuren ist der jeweilige Gehalt des Zellsaftes an Biokolloiden und ihr Ladungszustand von ausschlaggebender Bedeutung.

Die im Durchschnitt geringe Speicherungsfähigkeit der Zwiebel-schuppen-epidermiszellen reicht nur für eine optisch nachweisbare Aufnahme von Fluorochromen aus, nicht dagegen für die geringer nachweisempfindlicheren Diachrome.

Die morphologisch sehr gleichartig erscheinenden Epidermiszellen ruhen-der Küchenzwiebeln lassen beträchtliche Speicherungsunterschiede ihrer Vakuolen erkennen.

5. Eine elektroadsorptive Bindung von Sulfosäuren durch das kolloide Eiweißsystem des Zytoplasmas und der Zellkerne ist in lebenden Zellen vermutlich aus sterischen Gründen und auf Grund der elektrischen Ladungsverhältnisse nicht möglich.

Erst wenn in bereits nekrotisch veränderten Zellen eine Auflockerung des Plasma-Eiweißgerüsts erfolgt ist (z. B. durch intrameierende Elektrolyte) kann auch eine geringe Speicherung sulfosaurer Farbanionen im Plasma und in den Kernen sekundär nachgewiesen werden.

6. Die von verschiedenen Autoren beobachtete Nichtaufnahme sulfosaurer Diachrome ist auf die ungenügende Nachweisempfindlichkeit der Hellfeldanalyse, die Nichtberücksichtigung der Dissoziationseigenschaften der untersuchten Farbstoffe und die Auswahl ungeeigneter Objekte mit ausgesprochen kolloidarmem Zellsaft zurückzuführen.

Literatur

- Albach, W., 1928, Zellenphysiologische Untersuchungen über vitale Protoplasmafärbung. *Protoplasma* 5, 412.
- Banus, G., 1927, Über den Einfluß des elektrischen Stromes auf die Permeabilität von Pflanzenzellen. *Pflügers Arch.* 202, 184.
- Bungenberg de Jong, H. G., und Bonner, J., 1935, Phosphatide Auto-Complex Coacervates as Ionic Systems and their Relation to the Protoplasmic Membrane. *Protoplasma* 24, 198.
- Collander, R., 1921, Über die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. *Jb. wiss. Bot.* 60, 354.
- 1930, Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla*, I. Die normale Zusammensetzung des Zellsaftes. *Acta Bot. Fenn.* 6, 1.
- 1937, Einige neuere Ergebnisse und Probleme der botanischen Permeabilitätsforschung. *Schr. Phys. ökon. Ges. Kgb.* 69, 251.
- 1942, Diffusion und adenoide Tätigkeit bei der Ionenaufnahme pflanzlicher Zellen. *Naturw.* 30, 484.
- und Holmström, A., 1937, Die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen seitens pflanzlicher Zellen — ein Beispiel der adenoiden Tätigkeit der Protoplasten. *Acta Soc. Fauna et Flora Fenn.* 60, 129.
- und Virtanen, E., 1938, Die Undurchlässigkeit pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. *Protoplasma* 31, 499.
- Döring, H., 1935, Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 53, 415.
- Drawert, H., 1937, Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Plastidenfärbung mit Säurefuchsin und Toluidinblau in fixierten pflanzlichen Zellen. *Flora* 131, 341.
- 1937, Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedenen H^+ -Konzentrationen. *Flora* 132, 91.
- 1940, Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle: II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 134, 159.
- 1941, Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle: III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. *Flora* 135, 21.
- Frey-Wyssling, A., 1938, Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. *Protoplasma-Monographien*, Bd. 15 (Borntr. Berlin).

- Gicklhorn, J., 1930, Zur Frage der Lebendbeobachtung und Vitalfärbung von Chromosomen pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 10, 345.
- und Dedjar, E., 1931, Beobachtungen an elektrisch gereizten Pflanzenzellen und die Frage des Nachweises reversibler Entmischung des Protoplasmas. *Protoplasma* 13, 592.
- Höber, R., 1929, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*. Leipzig: Engelmann.
- 1933, Über den Einfluß des elektrischen Stromes auf die Permeabilität von Pflanzenzellen. *Protoplasma* 19, 26.
- Höfler, K., 1939, Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. *Protoplasma* 33, 545.
- Houska, H., 1939, Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. *Österr. Bot. Ztschr.* 88, 161.
- 1941, Beiträge zur Kenntnis der Kappenplasmolyse, Zur Ätiologie und protoplasmatischen Anatomie der Kappenplasmolyse bei *Allium Cepa*. *Protoplasma* 36, 11.
- Küster, E., 1912, Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. *Jb. wiss. Bot.* 50, 261.
- 1926, Über vitale Protoplasmafärbung. *Ztschr. wiss. Mikrosk.* 43, 378.
- 1939, Über Vakuolenkontraktion und Anthozyanophoren bei *Pulmonaria*. *Cytologia* 10, 44.
- 1940, Neue Objekte für die Untersuchung der Vakuolenkontraktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 58, 413.
- 1940, Über vitale Aufnahme saurer Farbstoffe durch lebende Pflanzenzellen. *Ztschr. wiss. Mikrosk.* 57, 153.
- Kölbel, H., 1947, Untersuchungen über die quantitative Farbstoffspeicherung von Akridinorange in lebenden und toten Zellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der lebenden und toten Plasma-Eiweißkörper. *Diss. Techn. Hochschule Hannover*.
- 1948, Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. *Ztschr. f. Naturf.* 4b.
- Naylor, E. E., 1926, The hydrogen-ion concentration and the staining of sections of plant tissues. *Amer. Journ. of Bot.* 13, 265.
- Overton, E., 1900, Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. *Jb. wiss. Bot.* 34, 669.
- Pekarek, J., 1930, Viskositätsbestimmung des Zellsaftes der Epidermiszellen von *Allium Cepa* und des Amöbenplasmas. *Protoplasma* 11, 19.
- 1933, Der Einfluß der Temperatur auf die Zellsaftviskosität. *Protoplasma* 20, 251.
- Pfeffer, W., 1886, Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* 2, 179.
- Pischinger, A., 1926, Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Wasserstoffionenkonzentration. *Arch. Zellf. u. mikr. Anat.* 3, 169.
- 1927, Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen und ihre Beziehung zur Färbung bei verschiedenem pH. *Arch. Zellf. u. mikr. Anat.* 5, 347.
- Rehm, S., 1935, Untersuchungen über den Wassertransport in *Impatiens Balsamina* L. und *Impatiens Roylei* Wal. *Planta* 23, 415.
- Ruhland, W., 1912, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. *Jb. wiss. Bot.* 51, 376.
- Searth, G. W., 1926, The mechanism of accumulation of dyes by living cells. *Plant Phys.* 1, 215.

- Schae de, R., 1923, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. Jb. wiss. Bot. 62, 65.
- Schumacher, W., 1933, Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. 77, 685.
- Suolahti, O., 1937, Über den Einfluß des elektrischen Stromes auf die Plasma-permeabilität pflanzlicher Zellen. Protoplasma 27, 496.
- Strugger, S., 1931, Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 49, 453.
- 1932, Über das Verhalten des pflanzlichen Zellkerns gegenüber Anilinfarbstoffen, ein Beitrag zur Methode der Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Kernphasen. Planta 18, 561.
- 1935, 1949, Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin: Bornträger, Heidelberg: Julius Springer.
- 1936, Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 24, 108.
- 1937, Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Chloroplasten mit Rhodaminen. Flora 131, 324.
- 1938, Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 132, 253.
- 1939, Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. III. Untersuchungen an *Helxine Soleirolii* Req. Biol. Zentralbl. 59, 409.
- 1940, Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena. Ztschr. f. Naturw. 73, 97.
- 1941, Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. Flora 135, 101.
- 1946, Die Fluorochromierung von Bakteriensporen mit Brillantsulfoflavin FF. D. T. W. 53, 145.
- 1932—1942, Zellphysiologie und Protoplasmatik (Fortschritte der Botanik). Berlin: Julius Springer.
- 1948, Zellphysiologie und Protoplasmatik. Fiat-Berichte (Pflanzenzelle); im Druck.
- Weber, Fr., 1921, Das Fadenziehen und die Viskosität des Protoplasmas. Österr. Bot. Ztschr. 70.

The Surface Precipitation Reaction in the Ovarian Frog Egg¹

By

Robert L. Terry²

(Zoological Laboratory, University of Pennsylvania)

With 8 Text-Figures

(Received August 6, 1949)

Although the formation of a new boundary about the exuded protoplasm of a torn or crushed cell is believed to be a general protoplasmic reaction, it has actually been observed in relatively few types of cells, due largely to limitations of technique. Heilbrunn (1927) termed this "the surface precipitation reaction" (abbreviated s. p. r.) and showed that it was dependent on the presence of calcium ions in the external medium. For references to its description and significance see Heilbrunn (1928, 1945). The literature seems almost devoid of observations on vertebrate cells. Hensen (1861) crushed blood cells of the frog and one of his figures shows the formation of a new boundary about the exuded protoplasm. Seitchik (1937) described the reaction in *Amphiuma* erythrocytes. Heilbrunn (1940), in studying the formation of a plug at the cut ends of isolated single muscle fibers of the adductor magnus of the frog, compared it to the s. p. r. The plug material increases at the expense of the intact protoplasm of the fiber. The rate of formation of plug material is increased in the presence of added calcium. There is, however, one important difference which has not been experimentally resolved. If the fiber is placed in oxalate or citrate solutions, which remove nearly all the free calcium from the external medium, the reaction is not prevented.

Types of cells suitable for the study of the reaction must possess certain characteristics. One should be able to obtain single cells free of the breakdown products of other cells. They should be large enough to

¹ A dissertation presented to the faculty of the Graduate School of the University of Pennsylvania in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy.

² Author's present address: Department of Biology, Union College, Schenectady, N.Y.

be crushed or torn easily. Size is also important in following single cells through various solutions. It is particularly advantageous to have relatively clear, undifferentiated cells in order that accompanying reactions in the interior of the cytoplasmic mass can be observed.

The purpose of this paper is to report the use of the young oöcyte of the frog for the study of the s. p. r. and to record some new observations which have been made on this material.

This work was carried out under the direction of Dr. L. V. Heilbrunn. It is a pleasure to express my thanks for his interest and criticism during its progress.

Material and Methods

Eggs of *Rana pipiens* Schreber were used almost exclusively for this study. A few observations were made on eggs of *Rana clamitans* Latreille but these were all confirmed on *Rana pipiens* Schreber. The following procedure was used in obtaining the eggs. An adult female frog was pithed and the abdominal cavity opened. If the prominent blood vessels in the abdominal wall are avoided, there is relatively little contamination with blood. The ovaries were removed entire by cutting through the mesovarium and placed in Ringer's frog solution (100 gm. H_2O , 0.65 gm. $NaCl$, 0.014 gm. KCl , 0.012 gm. $CaCl_2$, 0.02 gm. $NaHCO_3$, and 0.001 gm. NaH_2PO_4). Buffered or unbuffered Ringer solutions were found to be equally satisfactory for this work. The unbuffered Ringer lacks $NaHCO_3$ and NaH_2PO_4 . In winter frogs, the ovaries are quite large and distended with the pigmented oöcytes which are ovulated and complete their maturation in the spring. Scattered among these are the small, transparent, unpigmented oöcytes which are the principal subject of this study. The oöcytes selected were approximately 150-275 microns in diameter. The cytoplasmic ground substance of cells of this size appears relatively homogeneous under the low power objective of the microscope with, generally, a few clumps of yolk material located toward the periphery. The ovaries of frogs obtained during the summer, or after ovulation, appear as small, light-colored hollow sacs and consist almost entirely of young oöcytes.

Small pieces of ovary were snipped off with scissors, washed in Ringer's fluid, and placed in Ringer's fluid under a binocular microscope. A 3¼ by 4 inch lantern slide cover glass ringed with a 1/8 inch wall of paraffin was found to be a convenient container for this preparation. The small oöcytes were dissected out of the ovarian mass with a pair of No. 10 sewing needles supported in needle holders.

Removal of the oöcyte from the follicular membrane is a more difficult procedure and, in most cases, this was not done. Parallel studies showed no effect of the follicle on the s. p. r. In uninjured eggs, the break in the follicle nearly always coincided with the break in the egg, with regard to both time and location of the break. In most cases, groups of three or four eggs were dissected out in a mass connected by ovarian tissue. Using this technique, the s. p. r. could be observed in several eggs in a single preparation. In general, the break in the egg occurred on the side opposite the ovarian connection and there was no indication that the presence of other eggs or egg exudates had any effect on the reaction in any one egg.

If the young oöcytes are injured during the dissection or if they are left in Ringer's solution for too long a period before use, the cytoplasm of the apparently intact egg becomes noticeably more granular and appears darker than that of a

normal egg. This granulation and darkening serves as a control on the condition of the egg.

To determine the presence or absence of an s.p.r., the eggs were washed in the desired solution, placed on a microscope slide in two or three drops of the solution and a cover slip was placed on top. This preparation was placed under the low power objective of the compound microscope. The excess of solution was drawn from under the cover slip with a small piece of filter paper and the eggs allowed to be broken by the weight of the cover slip. Occasionally, slight pressure with a needle on the cover slip was necessary in order to break the eggs. In some cases, eggs were placed on a slide without a cover slip and torn by means of a fairly stout glass microneedle held in the hand. The observations reported represent the results obtained from crushing a minimum of fifty eggs.

Preparations of yolk platelets were made as follows. Entire ovaries containing large, pigmented eggs were washed in 0.05 molar sodium citrate to bind any calcium ions present in the external medium. The ovaries were then placed in a Waring Blendor with some of the citrate solution, about 50 ml. of solution for two ovaries, until the suspension appeared fairly uniform. This suspension was filtered through a loose layer of glass wool to remove any ovarian and egg fragments, and the filter was then washed two or three times with 25 ml. portions of sodium citrate solution. The filtrate was either placed in a cylinder and allowed to settle by gravity or centrifuged very lightly (about 300 r.p.m. for three minutes in an International, Size I, centrifuge). By either method, the yolk platelets settled quite rapidly as a cream to yellow colored layer on the bottom of the container. Too vigorous centrifugation must be avoided, as the platelets tend to pack very tightly and are difficult to resuspend. The supernatant fluid was poured or drawn off, the granules were resuspended in 0.05 molar sodium citrate and again centrifuged or allowed to settle. The resuspension was repeated and microscopic examination showed that this gave a fairly pure preparation of yolk platelets with very few of the smaller pigment granules.

Extracts of heat killed tissue were prepared according to the procedure used by Heilbrunn, Harris, Le Fevre, Wilson and Woodward (1946). A weighed amount of minced frog muscle (fifty grams is convenient) was extracted with twice the weight of distilled water plus one ml. of 0.8 molar CaCl_2 or KCl per 100 ml. of water for six hours at a temperature of 40-45°C. This was then filtered and the filtrate quickly brought to a boil and again filtered. The filtrate was evaporated to dryness and the residue dissolved in 25 ml. of absolute methyl alcohol per 50 gm. of original tissue. This was filtered and the filtrate evaporated to dryness. The residue was dissolved in a sufficient amount of distilled water so that one ml. of the final solution contained the extracted material from 5 gm. of original tissue. The freezing point of this solution was determined with a Beckmann thermometer.

The salt solutions used were made up from Merck "Reagent Grade" Chemicals. Hydrogen ion determinations were made using a Beckman pH Meter.

Observations

The first group of observations reported below have been made on the young, transparent frog oöcytes.

If a young frog oöcyte is broken in a solution of CaCl_2 isotonic with frog Ringer, the protoplasm begins to flow out of the egg but this flow ceases very quickly and a limiting boundary is formed about the exudate (Fig. 1). The protoplasm at the boundary appears darker and more

granular than that in the egg interior. This darkening gradually proceeds further into the exudate until the entire exudate is darker and more granular than the material left within the ovum. After a short period, depending on the extent of the injury at the egg surface, the cytoplasm within the egg becomes darker and more granular. If the calcium ion is bound by isotonic sodium citrate (0.071 molar) or sodium oxalate (0.086 molar), the s. p. r. does not occur (Fig. 2).

When the isotonic CaCl_2 solution is diluted with calcium-free Ringer, the limiting boundary of eggs broken in the dilution gradually becomes less well defined until a calcium concentration is reached in which there is complete dispersion. Because the transitions are gradual, it was impossible to determine, within close limits, a limiting calcium concentration just strong enough to produce a definite s. p. r. Observations on at least 200 oöcytes indicated that the limiting concentration was a solution between 0.01 and 0.03 molar in calcium ion.

Eggs broken in BaCl_2 and SrCl_2 solutions also show an s. p. r. The minimum concentration of both ions was found to lie in the same range as that of calcium ion (i. e. 0.01–0.03 molar). The magnesium ion is not as effective as these other three divalent cations. One-tenth molar MgCl_2 causes the exuded protoplasm to form a rather loose coagulum with a very poorly defined boundary.

Heilbrunn (1928) found that high concentrations of calcium prevented the s. p. r. in the *Arbacia* egg. An inhibition of this type is also present in the frog oöcyte although it is difficult to determine because it occurs in the hypertonic range. The eggs must be tested immediately after being placed in the solution, before osmotic shrinkage and the consequent internal gelation set in. The boundary formed in 0.2 molar CaCl_2 is very much less distinct than that in isotonic solutions (0.08 molar). The boundary is visible though faint in concentrations of CaCl_2 up to 1.0 molar. The darkening of the protoplasm of the exudate is also less pronounced in hypertonic CaCl_2 solutions.

When oöcytes in Ringer's fluid are centrifuged in an International, Size I, centrifuge at 3000 r. p. m. (approximately 2500 \times gravity) for one hour, the visible particulate components within the egg are separated from

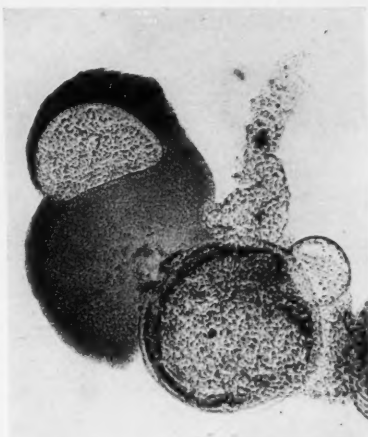


Fig. 1. Young oöcyte broken in isotonic calcium chloride. The exudate is toward the left of the figure. Note the germinal vesicle in the exudate with the coagulated mass in the center. The round, clear object above and to the right of the broken oöcyte is a smaller oöcyte. Magnification: 70 \times

the hyaline cytoplasm. If the centrifuged oöcytes are then broken in isotonic CaCl_2 , the s.p.r. and darkening occur in all cells independent of the location of the break.

Acids can affect the s.p.r. The effects of various acids were found to depend on the nature of the acid used. In conducting these experiments, the eggs were first washed in isotonic sodium citrate to remove any calcium ions present in the medium. The acids used were made up in concentrations of 0.1 molar and dilutions were made with calcium-free, unbuffered Ringer's fluid. The experiments were repeated many times.



Fig. 2. Young oöcyte broken in isotonic sodium citrate. The exudate is toward the top of the figure. The kidney-shaped object is the exuded germinal vesicle containing the nucleoli.

Magnification: 70 \times .

Eggs broken in HCl, at hydrogen ion concentrations below pH 2.6-3.0, show a very sharp limiting boundary. There is an extremely pronounced wave of darkening, commencing at the periphery of the exovate and proceeding centrally toward the site of the egg break over the course of five to twenty seconds, the rate depending on the pH, with the shorter time in solutions of lower pH. Following this darkening wave in the exudate in HCl, the exudate tends to clear. In solutions with a pH below 2, the clearing occurs very shortly after the darkening wave has passed. The impression given is that of a dark band moving through the exudate (Fig. 3).

The boundary formed on the exudate by strong acids is much sharper than that formed by calcium. It appears as a distinct line surrounding the exudate. In calcium solutions (Fig. 1), it appears more as a coagulated layer of granular protoplasm. The protoplasm of the exudate of acid treated cells appears under low power as a hyaline mass with a slight brownish tint. That of calcium treated cells appears coarsely granular and much darker. The acid picture given by HCl is also given by oxalic acid and citric acid.

If this darkening reaction is taken as an indication of entrance, strong acids apparently do not enter the intact oöcyte. When entrance does occur, it seems to occur at a point where the egg membrane is injured. The first evidence of injury appears as a dark area at any point on the egg periphery and this spreads as a wave through the cell in the same manner as the acid reaction in the exudate.

Eggs broken in solutions of acetic acid of pH approximately 4 (3.8-4.2) also show an s.p.r. Darkening occurs but without the pronounced wave

front which is seen in strong acids. The exudate appears as a dark, granular mass which, after a time, gradually becomes lighter. Acetic acid at this pH seems to enter the cell fairly rapidly. The intact egg gradually darkens from the periphery inward. There is no evidence that entrance occurs at an injured point on the periphery as appears to happen when eggs are placed in strong acids.

The effects of buffer solutions very closely resemble those of weak acids. In 0.1 molar citric acid-disodium phosphate mixtures or acetic acid-sodium acetate mixtures below pH 5.2-5.6, the exudate shows an s.p.r. and gradual darkening from the periphery inward. Eggs broken in glycine-HCl mixture below pH 3.8-4.2 show an s.p.r. and darkening.

In solutions of high pH, there is no new boundary formed on broken eggs. This is true of eggs immersed in glycine-NaOH mixtures up to pH 11.5, 0.1 molar NaOH, and in 0.1 molar KCN. Alkaline solutions seem to have a liquefying action on the egg protoplasm. When the cell is broken in solutions of high pH, the entire contents pour out, while in Ringer's fluid the major part of the exovate is from the inner cytoplasmic layer.

Eggs broken in mixtures of one part glycine-NaOH buffer to one part of 0.1 molar CaCl_2 show an s.p.r. and darkening of the exudate in pH's of buffer as high as 11.5. Mixtures of one part 0.1 molar CaCl_2 to one part 0.1 molar KCN also give an s.p.r. and darkening of the exudate. The pH of these mixtures was about 10.

Heilbrunn and others (1946) reported that extracts of many heat killed tissues of both vertebrates and invertebrates gave an s.p.r. in the *Arbacia* egg. These workers found that muscle extracts were among the most potent. The activity of thirteen different preparations of heat killed frog muscle, prepared according to their method, was investigated in relation to production of an s.p.r. in the frog oöcyte. In each of the experiments given below, results are based on observation of at least fifty oöcytes. The freezing points of these extracts varied about a value of -1.5°C . When the extracts were diluted with distilled water to a concentration isosmotic with 0.1 molar NaCl, as calculated from freezing point

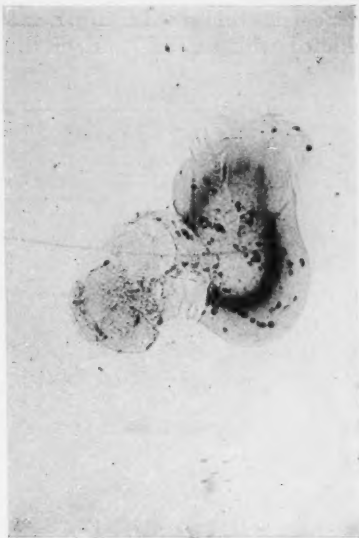


Fig. 3. Young oöcyte broken in 0.1 molar hydrochloric acid. The exudate is toward the right of the figure. Both the darkening and clearing waves are visible in the exudate. The germinal vesicle shows very indistinctly within the broken egg. Magnification: $80\times$.

data, eggs crushed in the solutions showed an s.p.r. with a pronounced darkening of the exuded protoplasm. Further dilution of these 0.1 molar extract preparations with calcium-free, unbuffered Ringer's fluid showed that the potency varied. One preparation diluted with nine parts of Ringer's fluid still caused an s.p.r. and darkening, another gave no s.p.r. when diluted with one-half part of Ringer.

Addition of one part of isotonic sodium oxalate or sodium citrate to one part of 0.1 molar extract showed no change in the reaction other than that which could be attributed to dilution in the less potent extracts.

In two experiments, 1 molar sodium citrate was substituted for CaCl_2 or KCl in the extraction medium. These had freezing points of -0.41 and -0.24°C . Eggs broken in these extracts showed no evidence of an s.p.r.

In two other experiments, whole frogs were heat killed by exposure to moist heat at 45°C . for four hours. The muscle was stripped off and extracted in the CaCl_2 medium for 18 hours in the refrigerator with the rest of the procedure as given above. These preparations showed no differences from those of the heat extracted muscle in CaCl_2 medium.

All the extracts mentioned above which caused an s.p.r. in the frog egg had a hydrogen ion concentration of pH 4.8 to 5.4 in the five gm. per



Fig. 4. Surface of the exudate of a pigmented oocyte broken in isotonic sodium citrate. Magnification: $80\times$.

ml. solutions. If 0.1 molar NaOH , 0.1 molar KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer mixtures or 0.1 molar acetic acid-sodium acetate buffer mixtures were added to these solutions, no s.p.r. took place when the pH was above 5.6-5.8.

The preceding observations have all been made on the young transparent oocytes. While the large, pigmented oocytes do not always give a well defined s.p.r., the exuded protoplasm exhibits a characteristic change in appearance in the presence of excess calcium ions in the medium. If one of these pigmented oocytes is broken in the presence of isotonic sodium citrate or sodium oxalate, there is an abrupt outflow of cytoplasm which ceases when pressure is released. The exudate appears to be a rather viscous mass packed with large and small granules. This mass seems at first to have a well defined boundary, but soon the granules are dispersed into the medium (Fig. 4). The smaller, pigment granules are dispersed

most rapidly but the large, yolk granules, the yolk platelets of Holtfreter (1946), are also seen to move out from the original boundary of the exudate.

If pigmented oöcytes are broken in isotonic CaCl_2 , a persistent sharp boundary is sometimes formed about the exudate (Fig. 5). If these preparations are allowed to stand for an hour or two, taking precautions against evaporation of the medium, fluid from the exudate collects in many transparent droplets of varying sizes at the exudate surface (Fig. 6). At other times, although a sharp boundary appears at first to be present, it gradually becomes evident that dispersal of granules is taking place. However, as the movement away from the main mass commences, all the granules in this area are seen to be small, pigment granules and there is no diffusion of yolk platelets. If a glass needle is inserted into the exudate and rapidly moved, pulling the exuded mass apart and exposing the yolk platelets to the external medium, the yolk platelets immediately disappear, leaving only the small granules visible in the exposed area.

In order to examine further the properties of the yolk platelets, suspensions were made in 0.05 molar sodium citrate, using the procedure described above. A drop of the platelet suspension was placed on a slide and covered by a cover slip. A drop of 0.1 molar CaCl_2 was placed at the edge of the cover and the preparation examined under the microscope. As the CaCl_2 moved under the cover and into the platelet suspension, the platelets broke up in a characteristic fashion (Figs. 7 and 8). Each elongated along its short axis and split into a series of rod-like structures perpendicular to the short axis. These rods then rapidly dissolved in the medium. This behavior was also shown when a drop or two of the platelet suspension was added to two ml. of 0.1 molar CaCl_2 contained in a 12×75 mm. (Kahn) tube. The platelets would immediately dissolve in the solution. Using this last method, and taking as the endpoint the lowest concentration in which the turbidity was visibly decreased, the effects of various concentrations of CaCl_2 were investigated. CaCl_2 solutions were made by diluting isotonic CaCl_2 with calcium-free Ringer's fluid. The platelets broke down immediately in solutions stronger than 0.05 molar. In 0.02 molar there was some turbidity which disappeared in 30 to 60 seconds. In 0.01 molar CaCl_2 there was no breakdown of the platelets and no change in appearance. Hypertonic solutions were prepared by diluting molar CaCl_2 with distilled water. In solutions of 0.4 to 1.0 molar CaCl_2

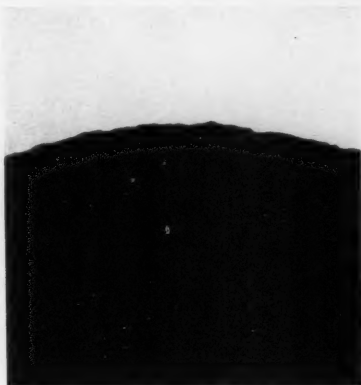


Fig. 5. Surface of the exudate of a pigmented oöcyte broken in isotonic calcium chloride. Magnification: 80 \times .

there was no marked disappearance of the platelets. In 0.5 molar CaCl_2 some of the platelets broke down. In 0.2 molar or below there was complete breakdown of the platelets. The platelets present in hypertonic CaCl_2 solutions differed in appearance from those in sodium citrate. They appeared swollen and the peripheries were much less refractile. When these suspensions of swollen granules were centrifuged and the supernatant fluid poured off and replaced with isotonic CaCl_2 they did not break down.

Solutions of BaCl_2 gave results almost identical with CaCl_2 . The platelets swelled in concentrations between molar and 0.4 molar, there was complete breakdown in solutions from 0.2 molar down to 0.04 molar, and no change in solutions 0.02 molar or less in BaCl_2 . In solutions of SrCl_2 or MgCl_2 , there was a marked difference in effect. There was complete breakdown of platelets in all solutions from molar down to 0.04 molar in both cases.

Hypertonic solutions of the monovalent cations also caused the platelets to break down. In none of these was there any evidence of swollen granules in concentrations up to 1 molar. The lower limits of breakdown for the salts used were: sodium acetate, 0.5 molar; NaNO_3 , NaCl , KCl , and NH_4Cl , 0.4 molar; Na_2SO_4 , 0.2 molar; sodium citrate, 0.1 molar.

Breakdown occurs in acid solutions below pH 5.2. The acids used were hydrochloric, oxalic, citric, and acetic. Platelets immersed in 0.1 molar acetic acid-sodium acetate or KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer mixtures broke when the pH was below 5.2. Platelets immersed in alkaline solutions broke



Fig. 6. Same view as Fig. 5. About 2 hours after breaking. Magnification: 80 \times .

when the pH was above 9.4. The solutions used were NaOH , KCN and $\text{NaOH-H}_3\text{BO}_3$ buffer mixtures.

When platelets are washed in 0.1 molar HgCl_2 and then immersed in 0.1 molar CaCl_2 , there is no breakdown. This protective action was present in concentrations of HgCl_2 down to 0.001 molar.

Heating the platelets in 0.05 molar sodium citrate for one minute at 40° C. caused them to break down. A firm pressure on the cover slip over a platelet suspension also caused a great many of them to break.

Discussion

Heilbrunn (1928, 1943) has suggested that the s.p.r. is a general protoplasmic reaction which occurs in the presence of free calcium ions in

the cellular environment. When the cut surface of a cell is exposed to calcium ions, there is an interaction between the calcium and some component of the cell substance which leads to a gelation of the surface of the exposed protoplasmic mass. In the case of the *Arbacia* egg, there is circumstantial evidence that the cytoplasmic component in this interaction is a granule fraction. When these eggs are broken in calcium the pigment granules in the exudate break down as the s.p.r. is taking place. Harris (1945) isolated the pigment granules of *Arbacia* by breaking the eggs in calcium free media. He found that on the addition of calcium these granules coalesce and lose their pigment.

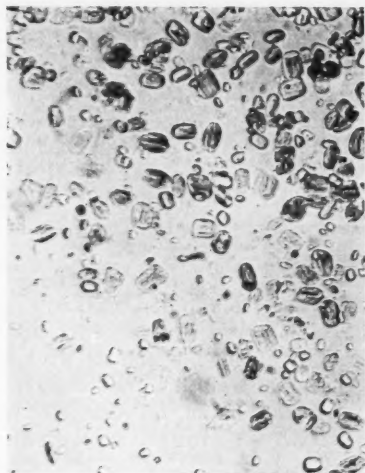


Fig. 7. Preparation of yolk platelets. Calcium is moving into the preparation from the lower left. Magnification: 80 \times .

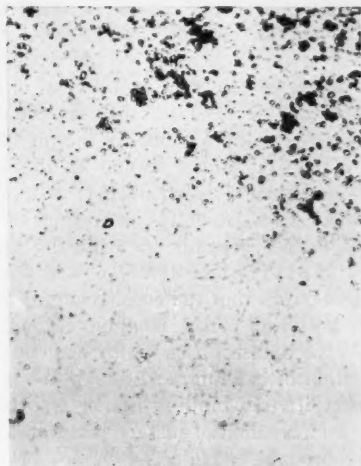


Fig. 8. Higher power view of yolk platelets. Calcium is moving into the preparation from the lower left. Magnification: 350 \times .

The breakdown of visible granules may not be causally associated with the s.p.r. Costello (1952) studied the s.p.r. in ova of several marine invertebrates of different phyla. He found that in some of the eggs studied (*Arbacia*, *Asterias*, *Echinarachnius*, *Cerebratulus*, *Nereis*) granular breakdown was seen in the exudate. In others (*Gonionemus*, *Phascolosoma*, *Amphitrite*, *Hydroides*, *Chaetopterus*, *Cumingia*, *Mytilus*, *Chaetopleura*, *Podarke*) the granules in the exudate apparently remained intact.

In the young oöcyte of the frog, it seems certain that, in the presence of calcium, a reaction occurs at the surface of the exposed cytoplasmic mass which is comparable with descriptions of the s.p.r. in other animal cells (Fig. 1). The concentration of calcium necessary to give the reaction in the frog oöcyte (0.01 molar gives a barely perceptible reaction) is some-

what higher than the concentrations which have been reported for other cells. Costello (1932) found definite reactions in 14 marine egg cells in sea water (approximately 0.01 molar in calcium). Heilbrunn (1934) reported positive results in *Arbacia* in a calcium concentration of 5×10^{-4} molar. This difference in the concentration of calcium necessary may be due to the presence of a larger amount of relatively inactive components in the cytoplasm which may mask or inhibit the reaction. Costello (1932) found no reaction in the cytoplasm of the eggs of *Crepidula* or *Tethyum* (*Styela*) when broken in sea water. He concludes that if an s. p. r. occurs in these eggs it is masked by the behavior of the yolk granules.

In the older frog eggs, containing pigment granules and a large concentration of yolk platelets, the granular material does at times mask the limiting surface of the exudate, if one is formed. Certainly there is a difference in reaction of the exudate mass depending on the presence or absence of calcium. If dispersal of cytoplasmic granules takes place in the presence of calcium, only the small granules are moved away from the mass. These are probably the pigment granules. There is a second fraction of small granules present in the intact egg, which Holtfreter (1946) has termed "lipochondria". According to him, the lipochondria break down in the same concentrations of calcium as the yolk platelets and thus would be absent in the diffusing material.

Holtfreter (1943) observed pigmented frog eggs after puncturing and found that the consistency of the exposed cytoplasm depended on the constitution of the medium. Monovalent cations produced dispersion and complete dissolution which was counteracted by the binding and solidifying action of calcium. Although Holtfreter apparently does not so interpret it, this binding action is probably a manifestation of what Heilbrunn calls the surface precipitation reaction. The evidence for this will be brought out later.

The observations on yolk platelets reported here agree, in general, with those of Holtfreter (1946). He does not report any evidence of intact, swollen granules in high concentrations of divalent salts. This may be due to the effect of the extracting medium. Holtfreter used several extracting media but citrate solutions were not included in his work. The difference may be due to developmental stage. Holtfreter used platelets from crushed neurula cells of frog embryos for the observations of cation effects. However, he does report that acids and alkalies had the same effects on platelets from eggs or embryos. Holtfreter's minimum concentrations for platelet breakdown (less than 0.125 molar Na or KCl, 0.008 molar CaCl_2 , 0.004 molar MgCl_2) are somewhat lower than those reported here. He used as his endpoint the lowest concentration which gave any microscopically visible breakdown. The endpoint used in the present work was the lowest concentration which gave a change in turbidity noticeable to the eye. In addition, Holtfreter found that preliminary soaking in lower concentrations of calcium or magnesium protected the platelets when immersed in strong KOH solutions. Holtfreter believes that each stage of swelling and liquefaction corresponds to a definite degree of ionization of the yolk

substance. The salt effects, he thinks, may be partially due to hydrolysis and lowering of the pH as well as specific effects of the metal cations.

It is difficult to distinguish effects on the surface of the platelet from effects on the interior. The characteristic manner of breakdown in calcium indicates a definite orientation of the substance of the platelet interior which is disorganized by the entering salt. The effect of HgCl_2 seems more likely to involve a coagulation of the surface of the platelet. A complete analysis of the platelet reactions must include analyses of both effects and their relations.

The question of whether a correlation exists between granule breakdown and the s. p. r. in the frog oöcyte has not been solved. Except for the reaction to alkaline solutions, the platelets of the large oöcytes break down under the same conditions which cause the production of an s. p. r. In the young oöcytes, however, where a limiting boundary is clearly shown in the s. p. r., there is no visible granule breakdown. If a causal relationship is present, there may be a breakdown of smaller components in the young oöcyte which are not visible with the ordinary microscope.

Heilbrunn (1928, 1943) has pointed out that in addition to purely surface effects of added calcium which give the surface precipitation reaction in the restricted sense, there are effects on the cytoplasmic interior which vary with the degree of injury to the cell when crushed. In the *Arbacia* egg, there is a progressive gelation of the protoplasmic mass which is of a wider extent as the egg is broken more violently or as the calcium concentration is increased, within limits. There is an increased area of pigment granule breakdown and a vacuolization of the interior cytoplasm. These reactions are believed by Heilbrunn to be due to an internal surface precipitation reaction. This picture is also given by the intact egg when it is subjected to any of a number of agents which stimulate the cell and which, in excess, cause injury. Heilbrunn has suggested that in the normal, intact cell the calcium present is mainly bound near the surface as a calcium lipo-protein complex. The action of stimulating agents is to remove calcium from this binding. The free calcium then diffuses into the cell interior and causes a vacuolization and gelation. For a discussion and references to the evidence for the calcium release theory, Heilbrunn (1943) may be consulted.

It has been pointed out that a progressive darkening takes place from the periphery inward in the exuded cytoplasmic mass formed when the young frog oöcyte is broken in the presence of calcium. Mere observation is not a reliable determination of viscosity change but this dark mass behaves in comparison with the initial cytoplasmic outburst as though it were a gel. The darkening appears to be an aggregation of cytoplasmic particles, too small to be definitely recognized, into larger, visible particles. It is also possible that this darkening may be due to refraction from the walls of many tiny vacuoles. It may be comparable to the reaction which Loeb (1906) observed in *Arbacia* eggs placed in strong hypertonic solutions and which he termed "dark cytolysis".

Now it appears evident that the binding action which Holtfreter

(1943) observed in the presence of divalent cations is a type of internal surface precipitation reaction. A point in favor of this interpretation is that Holtfreter found magnesium ion to be much less effective than calcium ion. This difference in action of magnesium and calcium has been emphasized by Heilbrunn and his group (see Heilbrunn, 1943, for references) and Heilbrunn has suggested a theory of magnesium anesthesia based on the difference.

The effects of pH on the production of the s.p.r. in the young frog oöcyte are more difficult to interpret. One of the difficulties is that the pH of the medium gives no indication of the pH inside of the cell. Jacobs (1920) presented a case in which an alkaline solution outside the cell increased the acidity inside the cell when it entered.

The effects of weak acids and buffer mixtures at acidic pH's resemble those of calcium. The darkening is more pronounced in these solutions and spreads more rapidly throughout the egg. Also, the cytoplasm tends to clear up again. The appearance of the exudate boundary is the same as that in calcium.

In strong acids the difference is much more marked (compare figs. 1 and 3). The structure at the surface of the exudate bears a greater resemblance to a definite membrane, both the darkening and the clearing proceed more rapidly in strong acids. The darkening seems to be more definitely of a granular nature in this reaction. The coloration is more of a brownish black as opposed to a greyish darkening in the presence of calcium.

It may be that the reaction in strong acids is not comparable to that in calcium. The surface film may be of an entirely different character. Various authors have described the appearance of granules in protoplasm following treatment with acids (see Klemm, 1895; Lewis, 1923). Lewis studied connective tissue cells from chick embryos, grown in tissue culture. These normally do not possess any visible granules. She found, on the basis of morphological evidence (granule formation), that coagulation of the nucleus occurred at pH 4.6 in all the following acids: sulphuric, hydrochloric, nitric, acetic, lactic, citric, oxalic, and picric. Heilbrunn (1928) points out that it is surprising that all these acids produce an effect at the same pH for the concentrations of the acids and their diffusion rates must differ enormously. Lewis used solutions of the acids mentioned with pH's as low as 3.8. She does not say whether there was any increase in effect or whether any solution of granules took place with lowered pH.

It is interesting to note that Heilbrunn's (1940) photographs of plug formation in the frog single muscle fiber indicate a darkening of the plug material in comparison with the intact portion of the fiber. Woodward (1948) has observed that in the presence of strong acids the plug darkens and then partially clears. He finds that at pH 2 or below the clearing wave follows the darkening wave very closely. Costello (1932) states in his discussion of the s.p.r. in shed eggs of *Chaetopleura* in sea water that "the spherules of the exudate budded off appear slightly darker than the normal protoplasm of the egg."

The observations on the effects of heat extracts of tissue on the s.p.r. in the frog oöcyte do not entirely agree with those of Heilbrunn and others (1946) on *Arbacia* eggs. These authors reported that extracts of minced tissues extracted at 45° C. or tissue extracts from animals which had been heat killed at 45° C. produced, when injected into normal animals, a death which gave the characteristic picture of shock. They also found that these extracts produced an s.p.r. and gelation of crushed *Arbacia* eggs. They believe these effects are due to a specific toxic substance or substances present in normal tissue but released in larger amounts from heat killed tissue. Their experiments showed that the substance(s) is readily dialyzable, not, in general, destroyed by boiling, but destroyed by vigorous ashing, and soluble in absolute methyl or ethyl alcohol. They concluded that the toxic factor(s) in their experiments was a diffusible (non-protein) substance and was organic rather than inorganic in nature. Referring to the work of Pen, Campbell, and Manery (1944) Heilbrunn's group concludes that part of the effects they observed might have been due to the potassium undoubtedly present in the extracts but present evidence to show that the whole effect was not due to potassium.

In production of the s.p.r. in the crushed frog oöcyte, the effect of the extracts was found to vary with the pH. If the pH of the extract was greater than 5.6–5.8 no s.p.r. took place. Heilbrunn and others (1946) found that extracts of frog muscle gave an s.p.r. in crushed *Arbacia* eggs at a pH of 6.15 or even higher. Their data show that as the extracts are concentrated the pH is lowered. In the 1946 paper, Heilbrunn concluded that "The effect is not due to the pH of the solutions; at any rate, ordinary mineral acids at pH 5 have no marked effect on the protoplasmic viscosity of *Arbacia* eggs, even after the eggs have been exposed to such solutions for an hour." Actually, the substance involved may well be a weak organic acid. Lewis (1923), in connection with the work which has previously been mentioned, also says that one of the most effective acids in bringing about the gelation of living cells was that obtained from sterile dead tissue which had stood for 20 hours in Locke-Lewis solution. The gelation produced could be reversed by washing off the solution. If the solution was not washed off, the cells died. She suggests that part of the toxic nature of crushed or burned tissues may be due to this factor.

Summary

1. The observation of a surface precipitation reaction (s.p.r.) in young oöcytes of the frog is reported. These cells are advantageous because of their size (approximately 150–275 microns in diameter), the ease of isolation, and the availability of the material throughout the year. When an oöcyte is broken in the presence of calcium ions, an s.p.r. takes place accompanied by a progressive darkening of the exuded portion from the periphery inward. There is no visible granule breakdown during the course of the reaction. Effects of other cations are described.

2. An s.p.r. also occurs in young oöcytes when the pH of the medium is lowered below a value which varies with the particular acid used. In

strong acids, the reaction shows marked differences from that in calcium which may indicate a fundamental difference in mechanism.

3. The effects of extracts of heat killed frog muscle show a marked variance with pH. Possibly the active component in these extracts is a weak organic acid.

4. Similarities are pointed out in the cytoplasmic reactions of the s. p. r. in the crushed oöcyte and in the frog single muscle fiber during plug formation.

5. Exudates of pigmented frog eggs show changes in appearance in the presence or absence of calcium which can probably be interpreted as an s. p. r. Isolation and examination of the yolk platelets of these eggs has shown that they break down in the presence of calcium and in acid and alkaline solutions, as Holtfreter (1946) has reported. Very likely, this breakdown is involved in the reaction of the exudate of the pigmented egg. It may indicate that, in the young oöcytes, there is a breakdown of smaller components which are not visible with the microscope.

Literature

- Costello, D. P., 1932. The surface precipitation reaction in marine eggs. *Protoplasma*, 17, 239.
- Harris, D. L., 1943. The osmotic properties of cytoplasmic granules of the sea urchin egg. *Biol. Bull.*, 85, 179.
- Heilbrunn, L. V., 1927. The colloid chemistry of protoplasm. V. A preliminary study of the surface precipitation reaction of living cells. *Arch. f. exp. Zellf.*, 4, 246.
- 1928. The colloid chemistry of protoplasm. Berlin: Borntraeger.
- 1934. The effect of anesthetics on the surface precipitation reaction. *Biol. Bull.*, 66, 264.
- 1940. The action of calcium on muscle protoplasm. *Physiol. Zool.*, 13, 88.
- 1943. An outline of general physiology. 2nd ed., Philadelphia: Saunders.
- Heilbrunn, L. V.; D. L. Harris; P. G. Le Fevre; W. L. Wilson; and A. A. Woodward, 1946. Heat death, heat injury, and toxic factor. *Physiol. Zool.*, 19, 404.
- Hensen, 1861. Untersuchungen zur Physiologie der Blutkörperchen sowie über die Zellennatur derselben. *Zeitschr. f. wiss. Zool.*, 11, 253.
- Holtfreter, J., 1943. Properties and functions of the surface coat in amphibian embryos. *J. Exp. Zool.*, 93, 251.
- 1946. Experiments on the formed inclusions of the amphibian egg. I. The effect of pH and electrolytes on yolk and lipochondria. *J. Exp. Zool.*, 101, 355.
- Jacobs, M. H., 1920. The production of intracellular acidity by neutral and alkaline solutions containing carbon dioxide. *Am. J. Physiol.*, 53, 457.
- Klemm, P., 1895. Desorganisationserscheinungen der Zelle. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 28, 627.
- Lewis, M. R., 1923. Reversible gelation in living cells. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 34, 373.

- Loeb, J., 1906. Über die Hemmung der toxischen Wirkung hypertotonischer Lösungen auf das Seeigeei durch Sauerstoffmangel und Cyankalium. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 113, 487.
- Pen, D. F.; J. Campbell; and J. F. Manery, 1944. Toxic substances from muscle. *Am. J. Physiol.*, 141, 262.
- Seitchik, J. N., 1937. The surface precipitation reaction of erythrocytes. Unpublished thesis. Univ. of Penna., Philadelphia.
- Woodward, A. A., 1948. Protoplasmic clotting in isolated muscle fibers. *J.C.C.P.*, 31, 359.

Über die Struktur und den molekularen Bau der lebenden Materie

Von

W. W. Lepeschkin

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 19 Textabbildungen

(Eingelangt am 17. Juli 1944)

1. Einleitung und kolloidchemische Nomenklatur

Unter der Struktur des Protoplasmas und anderer Arten der lebenden Materie wird gewöhnlich ihre morphologische Struktur verstanden, d. h. die Anwesenheit bestimmter mikroskopisch sichtbarer Formenelemente und Gebilde in ihnen, die nach ihren Entdeckern eine große Rolle für die physiologischen Vorgänge der Zellen spielen sollen. Man suchte vor allem im Protoplasma ein festes Gerüst festzustellen, weil man nicht glauben wollte, daß sich die komplizierten Lebensvorgänge in einer vollkommen flüssigen Maschine abspielen können. Die Existenz einer flüssigen lebenden Materie schien auch manchen unter den ersten Erforschern des Protoplasmas nicht wahrscheinlich zu sein. Daß aber die im aktiven Zustande befindliche lebende Materie in ihrer Hauptmasse flüssig sein kann, zeigten die Beobachtungen zahlreicher Naturforscher. Die betreffende Literatur ist in meiner Kolloidchemie des Protoplasmas nachzusehen, wo auch die Tatsachen angeführt werden, die zum Schlusse veranlassen, daß die Konsistenz der lebenden Materie im allgemeinen veränderlich ist, und daß diese Veränderlichkeit nur durch kolloidchemische Vorgänge in der Zelle erklärt werden kann. Somit ist die Frage über die Struktur der lebenden Materie mit der über ihren kolloidchemischen Bau verbunden. Daß diese Vorgänge das mikroskopische Aussehen der lebenden Zelle beeinflussen und möglicherweise sogar verursachen, bezweifelt zurzeit wohl kein Zellphysiologe. Auch in der vorliegenden Arbeit werden diese Vorgänge bei der Erklärung der morphologischen Eigentümlichkeiten der lebenden Materie herangezogen. Um Mißverständnisse zu vermeiden, müssen wir vor allem einige wichtige Begriffe der Kolloidchemie, die bei Biologen nicht einheitlich verstanden werden, eindeutig definieren.

Zuerst betrachten wir kolloidchemische Begriffe, die sich auf den Aggregatzustand der lebenden Materie beziehen. In meinem oben zitierten Buche wurden verschiedene Gründe angeführt, die uns veranlassen, mit W. Ostwald diejenigen Körper als flüssig zu bezeichnen, deren innere Reibung bei freier Bewegung ihrer Moleküle nicht genügend groß ist, um die Bestre-

bung ihrer Oberflächenspannung, ihnen Kugelgestalt zu erteilen, zu hindern, vorausgesetzt, daß auf die Körper keine Außenkräfte wirken und daß sie sich in einer mit ihnen nicht mischbaren Flüssigkeit befinden. Dagegen sind die Moleküle der festen Körper nicht in allen Richtungen frei beweglich und die Anziehungskräfte und innere Reibung zwischen denselben so groß, daß sie durch die Oberflächenspannung nicht überwunden werden können und die Körper kein Bestreben haben, Kugelgestalt anzunehmen. Nach dieser Definition nehmen alle Flüssigkeiten, im Gegensatz zu festen Körpern, in Wasser eine Kugelgestalt an. Auch Wasser nimmt die Kugelform in anderen Flüssigkeiten an. Außerdem können nur Flüssigkeiten Strömungen und fließende Bewegungen zeigen, die wenigstens unter dem Mikroskop wahrgenommen werden können. Unsere Definition des flüssigen und festen Zustandes macht die Ausdrücke „festflüssig“, „halbflüssig“, „halbfest“ usw. gegenstandslos; sie können durch die Ausdrücke „viskös“ und „sehr viskös“, „zähe“, „sehr zähflüssig“ usw. für Flüssigkeiten und „weich“, „sehr plastisch“ usw. für feste Körper ersetzt werden. Auch der Ausdruck „Gel-Lösung“ für sehr visköse kolloide Lösungen ist überflüssig und kann irreführend sein. Als Gel oder Gallerte sind nur feste Körper zu bezeichnen, die bei einer verhältnismäßig großen Formelastizität, wie z. B. Gelatine-Gallerte, leicht in Stücke gebrochen werden können und sich dadurch von echt elastischen Körpern, wie z. B. Kautschuk, unterscheiden. Nach Staudinger entspricht der Gelzustand durchaus dem festen Zustand: die Moleküle sind in einer Gallerte nicht frei in allen Richtungen beweglich, sondern es ist nur ihre Achse drehbar (Staudinger 1940, S. 73). Es ist also gar nicht passend, wenn Seifriz (1928) die kolloiden Lösungen, die infolge der Anwesenheit fadenförmiger Kolloidteilchen elastische Eigenschaften haben, als Gallerten bezeichnet. Unter Gelen bilden die sogenannten Emulsionsgallerten, die eine Schaumstruktur haben, eine besondere Gruppe. Sie entstehen infolge der Verdichtung von Emulsionen und hydrophiler Kolloidlösungen, und sind nur schwach elastisch, aber plastisch (vgl. Lepeschkin 1911, Kolloidchemie des Protoplasmas, II. Aufl., S. 96, auch Derjaguin 1935). Im Falle der Flüssigkeit dürfen wir also nur von einer Viskosität sprechen; diese ist in den Kolloidlösungen, deren Teilchen oder Makromoleküle fadenförmig sind, auch bei kleinen Konzentrationen sehr groß (vgl. Staudinger a. a. O.). Hier soll betont werden, daß wir unter Kolloidlösungen Dispersionen verstehen, deren Teilchen, unabhängig davon, ob sie Moleküle oder molekulare Aggregate (Mizellen) sind, 10^3 bis 10^9 Atome enthalten (Staudinger 1940), wobei dieselben nicht nur durch Hauptvalenz-, sondern auch durch Nebenvaleanzkräfte miteinander verbunden sein können. Diese Teilchen sind auch in Gallerten vorhanden; sie sind aber in diesem Falle miteinander gerüstartig verbunden, wobei sie gewöhnlich fadenförmige Mizellen bilden, die miteinander verfilzen und verwachsen (so z. B. bei Gelatine und Isopseudozyanin, vgl. Northrop und Kunitz 1931, Lepeschkin 1943 a und b). Die rundlichen Kolloidteilchen in Proteinlösungen, die gewöhnlich nur aus einem Molekül bestehen, dessen Hauptvalenzketten zusammengerollt sind, können auch Mizellen genannt werden, weil sie nicht nur von dichten Wasserhüllen umgeben sind, sondern

Wassermoleküle auch in ihrem Inneren enthalten, so daß sie ebenfalls Aggregate von Molekülen sind. Enthält das Proteinteilchen viel Wasser in seinem Inneren, so erteilen die Wassermoleküle auch seiner Hauptvalenzkette und also dem ganzen Teilchen die Wärmebewegungen, die für einen flüssigen Körper charakteristisch sind, so daß das Teilchen flüssig ist. In der Tat, werden die Wasserhüllen solcher Teilchen durch eine hydrophile Substanz entfernt, während das innere Wasser im Teilchen zurückbleibt, so können die Teilchen in ihren Bewegungen zusammenstoßen, sich durch Kohäsionskräfte verbinden und größere Tröpfchen bilden, die sich absetzen und zu einer einheitlichen Flüssigkeit zusammenfließen. In dieser Weise entstehen Fluide, die als mizellare Flüssigkeiten betrachtet werden können (Lepeschkin 1938 a und b, 1944). Der von Bungenberg de Jong für die flüssigen Niederschläge stammende Name „Koazervate“ ist, wie ich gezeigt habe (a. a. O.), unpassend, weil er von der Vorstellung über einen Bienenschwarm herkommt, während Fluide, wie wir sahen, eine andere Struktur haben.

2. Ältere Theorien der Protoplasmastruktur

Die Theorien der Protoplasmastruktur, die von Frommann, Flemming und Altmann verteidigt wurden, wurden oft kritisiert, und es ist kaum notwendig, hier alle Argumente pro und kontra anzuführen. Die betreffende Kritik finden wir in den ausgezeichneten Abhandlungen von Berthold (1886), Bütschli (1892) und Fischer (1899). Die genannten Theorien entstanden bekanntlich aus dem Bestreben, einzelne morphologische Strukturelemente zur Basis einer allgemein gültigen Strukturtheorie der lebenden Materie zu verwenden. Bütschli erschien die Theorie des netzartigen Baues von Frommann, diejenige des fibrillären Struktur von Flemming und die Granulalehre von Altmann deshalb unzutreffend, weil sie temporär entstehende Protoplasmaeinschlüsse oder grobe Strukturen, die durch unbelebte Körnchen oder Vakuolen gebildet werden, als den Bau der lebenden Materie betrachteten und weil sie den flüssigen Eigenschaften des Protoplasmas widersprachen.

Im Gegensatz zu Theorien fester Strukturen im Protoplasma, die nach Berthold (a. a. O. S. 62) nicht imstande waren, auch nur „irgendeinen der einfachen vitalen Bewegungsvorgänge im Protoplasma mechanisch zu erklären“, schien die von Bütschli verteidigte Theorie einer Schaumstruktur des Protoplasmas auch eine einfache Erklärung solcher Bewegungen durch den Vergleich des Protoplasmas mit künstlichen „Schäumen“ zu geben, die unter dem Einfluß der Oberflächenspannung amöboide Bewegungen ausführen können. Man darf aber nicht außer Acht lassen, daß die von Bütschli beschriebenen Schaumstrukturen fast ausschließlich am toten Protoplasma beobachtet wurden nach Bütschli aber auch leblosen Objekten eigen sein sollten. Andererseits gleichen die von Bütschli abgebildeten Strukturen nicht den eigentlichen Schaumstrukturen, weil die Wände der Schaumwaben in seinen Abbildungen sich unter allen möglichen Winkeln schnitten, während in echten, aus zwei Flüssigkeiten oder aus Flüssigkeit und Gas bestehenden Schäumen die Wabenwände sich stets

unter gleichartigen Winkeln schneiden. Außerdem zeigte Lepeschkin (1911), daß Schäume (z. B. aus Xylol und Seifenlösung) gallertartig sind (Emulsionsgallerten, vgl. Abschn. 1). In den Versuchen von Bütschli, wo eine amöboide Bewegung beobachtet wurde, handelte es sich nach Lepeschkin nicht um Schäume, sondern um dichte Emulsionen, die noch flüssige Eigenschaften zeigten.

Schon die gleichzeitige Existenz mehrerer Theorien, die auf direkten Beobachtungen basierten, sprach für die Unmöglichkeit, solche Strukturen, wie sie die einzelnen Beobachter beschrieben, auf das Protoplasma im allgemeinen zu übertragen. Diese Bedenken veranlaßten Reinke (1881, 1911), zu schließen, daß die Protoplasmastrukturen polymorph sind. Zu demselben Schluß kam auch Fischer (1899). Einen Polymorphismus des Protoplasmas nimmt auch Ruzicka (1907) an. Nach diesen Forschern kann das Protoplasma verschieden geformte Elemente ungleicher Konsistenz enthalten, die während des Lebens Veränderungen unterliegen. Das Protoplasma könne entweder homogen und undifferenziert erscheinen, oder eine Struktur besitzen, die in Form von Körnchen, Tröpfchen, Fäden oder kombinierten Bildungen und Gerüsten auftritt.

Die späteren Untersuchungen bestätigten den Polymorphismus der morphologischen Struktur der lebenden Materie. Was speziell die fibrilläre Struktur anbelangt, so wurde sie an fixierten und gefärbten Präparaten auch in letzter Zeit beobachtet (vgl. Tomita 1934, Meyer 1935, Fowell 1936). Sie ist aber in manchen Fällen auch in lebenden Zellen sehr wahrscheinlich. Nach Lepeschkin (1925, 1938 b) kann z. B. die Form der Erythrozyten der Mammalia sowohl durch die oberflächliche feste Haut (Hülle), als auch durch gelatinöse innere Partien des Protoplasmas (Zytoplasmas) bedingt sein. Boehm (1935) berechnete die Menge der Eiweißkörper, die nach der Hämolyse der roten Blutkörperchen ungelöst zurückbleiben, und kam zu dem Schlusse, daß diese Menge nicht nur zur Membranbildung, sondern auch zur Bildung eines Fachwerkes im Innern der Blutkörperchen ausreichen würde. Lepeschkin (1938 b) spricht infolgedessen den Gedanken aus, daß ein unsichtbares Fachwerk aus den erwähnten Eiweißkörpern gerade die Verdichtung der Protoplasmapartien in den Mammalia-Erythrozyten verursachen kann.

Andererseits kommt die Schaumstruktur des lebenden Protoplasmas nur selten vor und da, wo sie vorkommt, wird sie gewöhnlich durch dicht gelagerte Vakuolen, die mit wässerigen Lösungen oder Nahrungsmaterial erfüllt sind, gebildet (vgl. Giersberg 1922, Strugger 1929, Gicklhorn und Möschl 1930, Seifriz 1930, Linsbauer 1932 u. a.).

Die geschilderte Verschiedenheit der mikroskopischen Struktur der lebenden Materie und ihre Ähnlichkeit mit den Strukturen, die Kolloidlösungen und Gallerten zeigen, veranlaßte Lepeschkin (1911, 1924, 1928, 1930, 1938 b) zu schließen, daß die einzig mögliche, allgemein gültige Struktur der lebenden Materie eine kolloidale Struktur ist. Mit Berthold (a. a. O.) nahm er an, daß das flüssige Protoplasma eine Emulsionsstruktur besitzt, betonte

aber, daß es zugleich eine Suspension und stets eine hydrophil kolloide Lösung darstellt.

3. Neue Theorien der Struktur der lebenden Materie

Wie in meiner Kolloidchemie des Protoplasmas wiederholt betont wurde, ist sowohl der Aggregatzustand als auch die Konsistenz des Protoplasmas veränderlich. Schon diese Veränderlichkeit schließt die Möglichkeit einer einheitlichen Struktur der lebenden Materie in ihren zahlreichen Modifikationen aus. Die Bestrebungen, eine einheitliche Struktur der lebenden Materie zu finden, verschwand jedoch nicht mit dem Mißerfolg der Morphologen. Die einheitliche unter dem Mikroskop sichtbare Struktur wurde durch eine unsichtbare ersetzt. Seifriz (1936) stellte sich diese Struktur als ein aus verwachsenen Polypeptidketten zusammengesetztes Gerüstwerk vor, wobei er die Veränderlichkeit des Aggregatzustandes der lebenden Materie durch thixotrope Eigenschaften der Protoplasmakolloide erklärte (a. a. O. S. 260). Da aber die Fließbarkeit und Abrundung des Protoplasmas (Zytoplasmas) in wässrigen Lösungen ihm wohl bekannt war (a. a. O. S. 151), nahm er an, daß alle Gele zum Fließen befähigt sind und daß sowohl sie als auch das flüssige Protoplasma ein Gerüst aus feinen Fasern besitzen (a. a. O. S. 260). Er nahm sogar an, daß jedes lyophile kolloide System ein Gel („jelly“) ist (a. a. O. S. 156). Zu dieser Ansicht soll bemerkt werden, daß ein kolloides System entweder flüssig oder gallertartig sein kann, aber nicht gleichzeitig beides. Was nun die Gerüststruktur des flüssigen Protoplasmas anlangt, so ist es bekannt, daß auch die thixotropen Gallerten ihre Gerüststruktur verlieren, wenn sie sich verflüssigen. Seifriz selbst muß zugeben, daß thixotrope Eigenschaften und Fließbarkeit eines Systems auf lockere Bindungen zwischen Fadenmolekülen des Gerüsts hinweisen (a. a. O. S. 259). Er müßte also auch zugeben, daß bei der Verflüssigung der thixotropen Gallerten eine Zerstörung der Brücken zwischen den Polypeptidketten stattfindet; er nimmt aber die Gerüststruktur auch im flüssigen Protoplasma an.

Zur Zeit wissen wir, daß in einer Flüssigkeit keine submikroskopische Struktur aus einem mizellaren oder molekularen Gerüstwerk existieren kann. Nach Staudinger (1932, 1943) kann die Viskosität einer kolloiden Lösung bei einem sehr großen Molekulargewicht der gelösten Substanz und langgestreckten (fadenförmigen) Teilchen außerordentlich hoch sein, und trotzdem behält die Lösung alle im Abschnitt 1 angeführten Eigenschaften der Flüssigkeiten. So ist z. B. eine 1proz. Lösung des Polystyrols EF, das ein Molekulargewicht von etwa 600 000 hat, in Benzol viskös wie Zuckersyrup, während seine 20proz. Lösung so wenig beweglich ist, daß sie beim ersten Eindruck für eine Gallerte gehalten werden kann. Trotzdem behält die Lösung alle Eigenschaften der Flüssigkeiten, weil die langfädigen Moleküle des Polystyrols miteinander durch keine Brücken verbunden sind und nur ein Filzwerk bilden (vgl. dazu Müller 1941 a und b). Entstehen aber Brücken zwischen den Polystyrolmolekülen, so wird der Stoff fest, unlöslich und nur quellbar (Staudinger 1940, S. 74). Es genügen schon 0,0025% Divinilbenzol, um durch Brücken ein lösliches, unbegrenzt quellbares Polystyrol in ein unlösliches, begrenzt quellbares Mischpolymerisat zu verwan-

deln (Staudinger 1940, S. 74). Jede Verwachsung der Fadenmoleküle durch Brücken führt also zur Erstarrung der flüssigen Lösung zu einer Gallerte. Später erklärte Seifriz (Seifriz 1942, S. 7), daß die Fließbarkeit eines Systems wie das des Protoplasmas vom Gleiten eines Moleküls an einem anderen abhängen kann, obwohl die beiden Moleküle durch Wasserstoffbindungen (zu einem Gerüst?) vereinigt sind; er verließ also seine frühere Polypeptidkettenbrückentheorie. Da aber, wie er erwähnt, Paulin Wasserstoffbindungen auch zwischen Molekülen in Wasser annimmt, so könnte flüssiges Protoplasma offenbar nur als eine wirkliche Flüssigkeit betrachtet werden.

Als auf einen Grund zur Annahme einer Gerüststruktur des flüssigen Protoplasmas weist Seifriz (a. a. O. S. 258) auf die Elastizität desselben hin. Diese Elastizität ist jedoch so schwach, daß sie auch von den Forschern, die sich in der Kolloidchemie des Protoplasmas spezialisiert haben, (z. B. Heilbrunn 1928) nicht anerkannt wird (vgl. meine Kolloidch. d. Protoplasmas, S. 55). Es ist jetzt bekannt, daß die Elastizität einer kolloiden Lösung nicht durch eine angebliche Gerüststruktur verursacht wird. Seifriz selbst sagt (a. a. O. S. 225), daß alle typischen lyophilen Kolloidlösungen eine Elastizität und als Folge Abweichungen vom Hagen-Poiseuilleschen Gesetz (d. h. ein anomales Fließen) zeigen. Nach Freundlich (1927) ist die Ursache der Elastizität der Sole die Kraftwirkung zwischen den Kolloidteilchen. Begreiflicherweise ist eine solche Elastizität in den Solen mit Fadenteilchen besonders ausgeprägt (vgl. Seifriz 1928).

Was nun die Abweichungen vom Poiseuilleschen Gesetz anlangt, die in letzter Zeit für flüssiges Protoplasma wieder beobachtet wurden (z. B. Northen 1936, Pfeiffer 1941), so sind lyophile kolloide Lösungen keine Newtonsche Flüssigkeiten (Staudinger 1943, Wo. Ostwald 1925, 1927, 1929, Kroepelin 1929, Reiner 1931) und zeigen Abweichungen vom genannten Gesetz. Nach Staudinger (1943) zeigen makromolekulare Lösungen mit fadenförmigen Molekülen starke Abweichungen vom genannten Gesetz, die bei Proteinlösungen besonders groß sind (a. a. O. S. 14). Wo. Ostwald erklärt diese Abweichungen bei Kolloiden mit kugeligen Mizellen durch die Deformation der Solvathüllen (1927), Freundlich und Reiner durch Elastizität und Staudinger durch die Orientierung der Moleküle und Schwarmbildung. Aus diesen Angaben ist zu schließen, daß die „Elastizität“ nicht nur für Gele, sondern auch für flüssige Kolloidlösungen charakteristisch ist, und besonders für die Lösungen mit langgestreckten Kolloidteilchen. Das flüssige Protoplasma kann also ein anomales Fließen und elastische Eigenschaften zeigen, ohne eine gerüstartige Struktur zu haben.

Noch ein Grund scheint Seifriz ausreichend zu sein, um eine molekulare Gerüststruktur für flüssiges Protoplasma anzunehmen. Er kam zu dem Schlusse, daß dasselbe mit Wasser nicht mischbar ist (a. a. O. S. 265), falls es lebend und gesund ist. Da aber diese Unmischbarkeit unabhängig von einer Haut an der Protoplasmaoberfläche ist, kann er sie nur durch die Anwesenheit eines Molekulargerüsts erklären. Die Unmischbarkeit des

flüssigen Protoplasmas mit wässrigen Lösungen kann jedoch auch durch die Annahme erklärt werden, daß das Protoplasma keine wässrige Lösung verschiedener Substanzen, sondern eine Lösung von Wasser in einer organischen Substanz ist, wie es im Falle der Fluide beobachtet wird (vgl. meine Kolloidch. d. Protoplasmas 1938 b, S. 140).

Die Eigenschaft des flüssigen Protoplasmas Wasser aufzunehmen, die nach Seifriz (1942, S. 5) durch ihre Emulsionsstruktur nicht erklärt werden kann, folgt ebenfalls aus ihrer Fluidstruktur (vgl. Abschnitt 5). Fluide können auch eine Koagulation aufweisen, die nach Seifriz den Emulsionen nicht zukommt.

Wir müssen also zum Schluß kommen, daß die Theorie der Molekulargerüststruktur von Seifriz für alle Arten der lebenden Materie ungegründet ist und den Angaben der modernen Kolloidchemie widerspricht. Dasselbe kann man auch über die sogenannte „Haftpunkttheorie“ der Protoplasmastruktur von Frey-Wyssling (1938) sagen, die als eine ausführliche Anwendung der Gedanken von Seifriz betrachtet werden darf.

Ich habe in meiner Kolloidchemie des Protoplasmas darauf hingewiesen, daß das flüssige Protoplasma fadenförmige Kolloidteilchen enthält. Der Fehler von Seifriz und Frey-Wyssling liegt aber darin, daß sie annehmen, daß diese Teilchen miteinander zu einer gerüstartigen Struktur verwachsen sind. Der zuletzt genannte Gelehrte scheint selbst zu fühlen, daß die Gerüststruktur dem Protoplasma gallertartige Eigenschaften verleihen müßte, wenn er schreibt, daß „das größte Wunder des cytoplasmatischen Molekulargerüsts“ seine auffallende Beweglichkeit ist, die in der Protoplasmaströmung zum Ausdruck kommt (a. a. O. S. 140).

Im flüssigen Protoplasma ist nicht nur keine Gerüststruktur möglich, sondern es enthält überhaupt nur eine unbedeutende Menge von langgestreckten Kolloidteilchen, worauf ich in meiner Kolloidchemie des Protoplasmas (1938) hingewiesen habe. Wenn in ihm eine große Menge derselben vorhanden wäre, so müßte die Viskosität des flüssigen Protoplasmas wenigstens einige Tausendmal größer sein als die des Wassers, weil die Konzentration der Kolloide in demselben sehr hoch ist (20 bis 40%). In Wirklichkeit ist aber diese Viskosität niedrig. So gibt Seifriz selbst in seinem Buche an, daß die Viskosität des Protoplasmas zwischen 10 und 800 schwankt (a. a. O. S. 217). Die meisten Kolloidteilchen (resp. Makromoleküle) des flüssigen Protoplasmas sind also rundlich ja vielleicht kugelig. Das gleiche folgt auch aus der Tatsache, daß dasselbe nur sehr selten eine Doppelbrechung des Lichts zeigt (vgl. Schmidt 1941). Die Doppelbrechung ist am Protoplasma meist sehr gering (Schmidt a. a. O. S. 48). In vielen Fällen erscheint aber das von mikroskopisch sichtbaren Einlagerungen freie Zellprotoplasma, selbst mit empfindlichsten Methoden geprüft, optisch isotrop. In anderen Fällen sind Eingriffe erforderlich, damit die Doppelbrechung zutage tritt (Abkühlung, Aufsaugung in Kapillaren, was zweifellos zum Absterben führt). Würde das flüssige Protoplasma viele Fadenmoleküle enthalten, so würde es wenigstens eine starke Strömungsdoppelbrechung zeigen, was aber auch nicht der Fall ist. Es ist ja bekannt, daß sogar in

2proz. Lösung des Tabakmosaikvirus, dessen Moleküle nur verhältnismäßig kurze Stäbchen sind (im Mittel ist ihre Länge 10mal größer als ihre Dicke), eine Strömungs- und Eigendoppelbrechung beobachtet (vgl. Lynen 1938) wird.

Was nun das „optisch leere“ Aussehen der intergranulären Phase des flüssigen Protoplasmas anlangt, so ist die Abwesenheit von im Ultramikroskop sichtbaren Teilchen (Ultramikronen) in ihm nicht den anisodiametrischen Bauelementen zuzuschreiben, wie Frey-Wissling meint (a. a. O. S. 3), sondern dem hydrophilen Charakter der Kolloidteilchen. Es gibt überhaupt keine hydrophilen Kolloidlösungen, unter denen sich auch diejenigen mit kugeligen Kolloidteilchen, wie z. B. Albuminlösungen, befinden, welche im Ultramikroskop Ultramikronen sehen lassen.

Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß die Unmöglichkeit einer molekularen Gerüststruktur sich nur auf das lebende und flüssige Protoplasma bezieht, während in erstarrten Teilen der lebenden Materie und im toten Protoplasma eine solche Struktur wohl möglich, aber nicht bewiesen ist. Es ist sehr wahrscheinlich, daß bei Denaturierung von Eiweißkörpern Bildung von Fadenmolekülen aus den kugelförmigen Molekülen und ihre Verfilzung und Verwachsung durch Brücken stattfindet, wobei Gallerten entstehen (vgl. Astbury 1935, Haurowitz 1935, 1936, Dervichian 1941). Eine Entfaltung der zu rundlichen Teilchen zusammengerollten Eiweißmoleküle und somit die Entstehung fadenförmiger Moleküle ist auch im flüssigen Protoplasma möglich. Langmuir (vgl. Adam 1930) und andere Forscher zeigten, daß z. B. rundliche Moleküle der Eiweißkörper, die infolge einer Adsorption an die Wasseroberfläche gelangen, sich entfalten, so daß ihre Polypeptidketten sich auf dieser Oberfläche ausbreiten. Gelangen also die hochmolekularen Substanzen des Protoplasmas an seine Oberfläche, so können ihre kugeligen Moleküle oder Mizellen sich in fadenförmige verwandeln, wobei die oberflächlichen Protoplasmaschichten die Struktur eines molekularen oder mizellaren Filzes annehmen könne, so daß die Viskosität dieser Schichten stark zunimmt (Ektoplasmaabildung). Da aber die Fadenmoleküle (oder Mizellen) in diesem Falle sehr nahe aneinander zu liegen kommen, können sie auch durch Brücken verwachsen und feste Gallerten bilden, die die Protoplasmaoberfläche als eine dünne Schicht bedecken. Solche feste Häute (z. B. Pellikula der Protozoen, Hülle der Erythrozyten) können unter der Einwirkung eines mechanischen oder osmotischen Druckes leicht verflüssigt werden (Lepeschkin 1925, 1938b). Es ist also möglich, daß diese Häute, besonders dann, wenn sie alternierend erstarren und flüssig werden (wie bei der Bewegung der Amöben), nicht aus thixotroper Gallerte, sondern aus Emulsionsgallerte gebaut sind, also eine submikroskopische Schaumstruktur besitzen. In dem Falle dagegen, wo die peripherischen Protoplasmaschichten eine Doppelbrechung zeigen (vgl. Ulrich 1936, Chinn 1937, 1938), ist anzunehmen, daß in ihnen geordnete fadenförmige Teilchen (Moleküle oder Mizellen) vorhanden sind und vielleicht eine regelmäßige Gerüststruktur bilden. In einigen Fällen sind im Ektoplasma die anisomorphen Teilchen (Moleküle oder Mizellen) gerichtet. Schmidt (1939, 1940) nimmt einen Folienbau des zähen Ektoplasmas bei *Amoeba verrucosa*

an, das eine schwache Doppelbrechung zeigt. Diese Folien können aber im flüssigen Ektoplasma nur Streifen sein. Es ist möglich, daß es im gallertartigen Zustande eine submikroskopische Schaumstruktur besitzt, wo solche Streifen aus Mizellen zerstreut sind. Jedenfalls ist die Erstarrung eines flüssigen Systems ohne eine Veränderung „der Konzentration“ keine spezifische Eigentümlichkeit des lebenden Protoplasmas, wie Seifriz annimmt (Seifriz 1942, p. 8).

Wir sehen also ein, daß die lebende Materie verschiedene kolloide Strukturen haben kann. Wie in meiner früheren Arbeit berichtet wurde (Lepeschkin 1939), ist die Struktur der lebenden Materie in dem Falle, wenn sie flüssig ist, derjenigen der flüssigen Niederschläge bei der flüssig-flüssigen Entmischung kolloider Lösungen ähnlich. Lepeschkin (1910) hat darauf zum erstenmal hingewiesen. Bungenberg de Jong und Mitarbeiter haben eine ganze Reihe von Arbeiten über diese Niederschläge veröffentlicht, die sie „Koazervate“ nennen, und auf die Ähnlichkeiten ihrer Eigenschaften mit denjenigen des Protoplasmas in verschiedener Hinsicht hingewiesen. Wie in Abschnitt 1 erwähnt, haben diese Niederschläge eine besondere Struktur und wurden von mir als Fluide bezeichnet (Lepeschkin 1938b, 1939, 1944).

4. Fluidstruktur der lebenden Materie

Der Gedanke, daß die flüssige lebende Materie die kolloide Struktur der Fluide besitzt, entstand aus der Beobachtung, daß diese Art der lebenden Materie, obwohl sie viel Wasser enthält, mit wässrigen Lösungen nicht mischbar ist (vgl. Lepeschkin 1910, 1924, 1925, 1926aa, 1938b, 1939). Daß Gallerten, die auch viel Wasser enthalten können, sowohl mit wässrigen Lösungen als auch mit reinem Wasser nicht mischbar sind, ist ohne weiteres verständlich, weil sie eine Gerüststruktur haben. Unter den Flüssigkeiten enthalten aber nur Fluide viel Wasser, ohne sich mit wässrigen Lösungen zu vermischen.

Wie früher erwähnt, können die Fluide als mizellare Flüssigkeiten betrachtet werden, die infolge eines Zusammenfließens der flüssigen Mizellen entstehen, deren Wasserhüllen durch ein entwässerndes Mittel entfernt sind. Die Mizellen werden von Hauptvalenzketten eines organischen Stoffes gebildet, die zu einem Knäuel zusammengerollt sind und viele Wassermoleküle in ihrem Inneren enthalten. Durch Molekularkräfte werden die Mizellen aneinander gezogen, wie in jeder Flüssigkeit, und bilden die Oberfläche des Fluids, die von der umgebenden Lösung scharf abgegrenzt ist. Da die Mizellen der Proteine gewöhnlich nur ein einziges Molekül enthalten, so ist anzunehmen, daß auch die Mizellen der Grundstoffe des Protoplasmas (Vita-proteide, Vitaide) nur aus einem Molekül bestehen. Wasser des Fluids, das sich in den Maschen der Hauptvalenzketten befindet, kann als gelöst in der organischen Substanz des Fluids betrachtet werden. In Anwendung auf die lebende Materie ist ebenfalls anzunehmen, daß auch ihr Wasser nicht Lösungsmittel, sondern in ihren organischen Substanzen gelöst ist.

An der Oberfläche des flüssigen Protoplasmas bilden die es zusammen-

setzenden Mizellen (unter der Einwirkung der molekularen Anziehungskräfte) gewöhnlich eine verdichtete Schicht, die auch an der Oberfläche der Vakuolen entstehen kann. Zwischen den Mizellen der Vitaide befinden sich Moleküle und Ionen niedermolekularer Substanzen, die zum Teil ins Mizellinnere eindringen und sich in dem da befindlichen Wasser lösen. Auch runde und langgestreckte Moleküle (oder Mizellen) anderer hochmolekularer Verbindungen können sich zwischen den Vitaidmolekülen befinden.

Schon lange hat der Verfasser den Gedanken ausgesprochen, daß die Grundsubstanzen der lebenden Materie (Vitaide) Komplexe von Eiweißkörpern, Lipoiden und anderen Substanzen darstellen (Lepeschkin 1911, 1926c u. a.). Es lag nun der Gedanke nahe, daß gerade Fluoide der Lipoproteide das flüssige Protoplasma zusammensetzen und seine morphologischen und zum Teil physiologischen Eigentümlichkeiten bedingen. Um diesen Gedanken zu prüfen, war es notwendig, Fluoide der Lipoproteide künstlich darzustellen und ihre Eigenschaften mit denjenigen des Protoplasmas zu vergleichen.

5. Fluoide der Lipoproteide und ihre Eigenschaften

Obwohl Verbindungen der Eiweißkörper und Lipoiden überall in den Organismen verbreitet sind, wurden sie künstlich erst in letzter Zeit erhalten. Herrera (1932), Crile, Telkes und Rowland (1932) berichteten, daß es ihnen gelungen ist, eine Verbindung von Eiweißkörpern und Lipoiden zu erhalten. Eine allgemein gültige Methode zur Darstellung der Lipoproteide wurde aber von Przylecki und Hofer (1936) gegeben (vgl. auch Wagner-Jauregg und Arnold 1938). In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoide der einfachsten Lipoproteide dargestellt.

Die Lipoproteide wurden nach der Methode von Przylecki und Hofer in alkalischen Lösungen erhalten. Die als Ausgangsmaterial verwendeten Proteine waren Gelatine, Albumose, Eialbumin und Oxyhämoglobin; die verwendeten Lipoiden waren Lezithin und Cholesterin. Gelatine war reinste pulverförmige Gelatine des Handels. Albumose wurde aus Pepton Witte durch Kochen, Filtrieren, Abkühlen und nochmaliges Filtrieren seiner Lösungen erhalten. Zur Darstellung des Oxyhämoglobins wurden Kaninchenerythrozyten mehrmals mit einer 1%igen Lösung von NaCl gewaschen, abzentrifugiert und in destilliertem Wasser gelöst; nach 5 Tagen (bei 5°C) wurden die Stromata durch Zentrifugieren entfernt. Albumin war gereinigtes Albumen ovi siccum von Merck, Lezithin war von Schering-Kahlbaum und Cholesterin von Merck. In einer vor kurzem publizierten Arbeit (Lepeschkin 1944) habe ich die Methoden zur Darstellung der Fluoide der Lipoproteide beschrieben. Sie wurden aus den Gemischen 10% (bzw. 20%) Proteinlösungen, deren pH auf 8,5 gesetzt war, mit einer alkoholischen Lezithinlösung, zu der in einigen Versuchen auch Cholesterin zugesetzt war, durch Sulfosalizylsäure oder Ammoniumsulfat niedergeschlagen. Die Ansäuerung der Gemische mit anderen Säuren führte nur zur Bildung feinkörniger Niederschläge der Lipoproteide. In einigen Fällen waren auch die Niederschläge hervorgerufen durch die genannten Reagen-

zien feinkörnig, schieden sich jedoch beim Abkühlen der bis 40° erwärmten Gemische als Fluide aus. Das Verfahren zur Darstellung einiger Fluide ist im folgenden angegeben:

I. Einfache Fluide. 1. Lezithogelatine. Mit 5 cm³ der bei 30° geschmolzenen 10%igen Gelatine (pH=8,5) wurde 1 cm³ einer 4%igen alkoholischen Lezithinlösung tropfweise gemischt. Die erhaltene Lösung wurde mit gleichem Volumen einer 4%igen Lösung von Sulfosalizylsäure in Wasser oder $\frac{2}{3}$ Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung vermischt, wobei das Fluid der Lezithogelatine ausgeschieden wird.

2. Lezithalbumose. Mit 10 cm³ einer 10%igen Albumoselösung (pH=8,5) wurde 5 cm³ einer 4%igen Lezithinlösung in Alkohol und das erhaltene Gemisch mit gleichem Volumen 4%iger Sulfosalizylsäurelösung gemischt, wobei das Fluid der Lezithalbumose niedergeschlagen wird.

3. Lezithohämoglobin. Mit 3,5 cm³ einer 10%igen Oxyhämoglobinelösung (pH=8,5) wurden 3 cm³ einer 4%igen alkoholischen Lezithinlösung tropfweise gemischt. Das erhaltene Gemisch wurde mit einem Überschuß der gesättigten Ammoniumsulfatlösung vermischt, wobei die roten Tropfen des Fluids des Lezithohämoglobins ausgeschieden werden.

II. Gemischte Fluide. 1. Lezithcholesterin-Albumose. 7 cm³ einer 10%igen Albumoselösung (pH=8,5) wurden mit 2 cm³ einer 2%igen alkoholischen Lezithinlösung, der 0,01 g Cholesterin und 2 cm³ Äther zugesetzt waren, vermischt. Der größte Teil des letzteren wurde durch Ausbreitung des Gemisches in einer Kristallisierschale entfernt, wonach die Flüssigkeit mit gleichem Volumen 4%iger Sulfosalizylsäure vermischt und das Fluid ausgeschieden wurde.

2. Lezithcholesterin-Albumose-Gelatine. Dem Gemisch von 5 cm³ geschmolzener 10%iger Gelatine und 5 cm³ 10%iger Albumoselösung (pH=8,5) wurden 2 cm³ einer 2%igen alkoholischen Lezithinlösung, die 0,01 g Cholesterin enthielt, tropfweise zugesetzt. Dann wurde Äther dem Gemisch zugesetzt, bis die Flüssigkeit sich klärte. Sie wurde bis 40° erhitzt, zweimal filtriert, abgekühlt und mit gleichem Volumen 4%iger Sulfosalizylsäure gemischt, wobei sich das Fluid absetzt.

3. Lezithcholesterin-Albumose-Albumin-Gelatine. Das Gemisch von 5 cm³ 10%iger geschmolzener Gelatine und 10 cm³ 10%iger Albumoselösung, der 0,05 g Albumin zugesetzt war (pH=8,5), wurde mit 4 cm³ 2%iger alkoholischer Lezithinlösung, die 0,01 g Cholesterin gelöst enthielt, vermischt. Äther wurde bis zur Klärung der Flüssigkeit zugesetzt und diese wurde mit gleichem Volumen 4%iger Sulfosalizylsäure gemischt, wobei das ätherhaltige Fluid ausgeschieden wurde. Äther wurde alsdann durch Stehenlassen in einer Kristallisierschale entfernt. Die Proportion der Proteine und Lipide wurde in einigen Versuchen verändert, so z. B. auf 5 cm³ 10%iger Albumoselösung, die 0,05 g Eialbumin enthielt, wurden 2 cm³ Gelatine und 3 cm³ Lezithinlösung mit 0,01 g Cholesterin zugesetzt. Auch wurde in einigen Versuchen Albumin weggelassen.

Die Eigenschaften der erhaltenen Fluide waren vielfach denjenigen des flüssigen Protoplasmas ähnlich. Wir betrachten zuerst die morphologischen Eigenschaften beider Arten der kolloiden Systeme.

A. Morphologische Eigenschaften der Fluoide der Lipoproteide

Die Tropfen der einfachen Lipoproteide, z. B. die der Lezithalbumose (vgl. I, 2) sind vollkommen homogen (Abb. 1)¹ oder enthalten nur Vakuolen, die bei der Bildung des Fluids aus der umgebenden Lösung entstanden sind (vgl. Abb. 2). Fließen die Tropfen zu einer einheitlichen Flüssigkeitsschicht

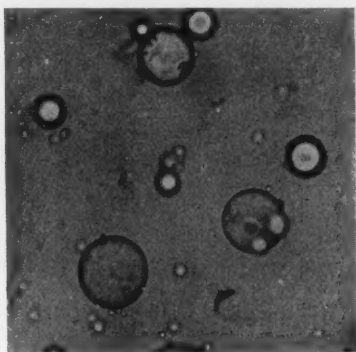


Abb. 1. Fluid der Lezithalbumose.

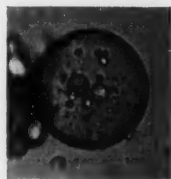


Abb. 2. Wie Fig. 1, aber der Fluidtropfen enthält Vakuolen.



Abb. 3. Wie Abb. 1, doch sind die Fluidtropfen zu einer einheitlichen Flüssigkeitsschicht zusammengefloßen.

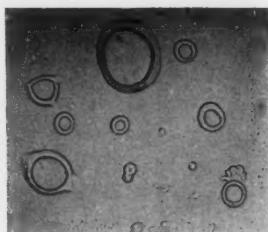


Abb. 4. Fluid der Lezithalbumose nach der Zugabe von Wasser: Vakuolisierung.

zusammen (vgl. Abb. 3), so erinnern sie lebhaft an das homogene Protoplasma: Wurde als Protein Oxyhämoglobin verwendet (vgl. I, 3), so hatten die kleinen Tropfen die Farbe der Erythrozyten, während größere Tropfen rein rot waren. Die Erythrozyten können bekanntlich nach der Verflüssigung ihrer Hülle auch kugelförmig sein. In diesem Falle ist die morpho-

¹ Die meisten Mikrophotographien sind bei der Vergrößerung 1 : 144 und 1 : 280 aufgenommen.

logische Ähnlichkeit zwischen denselben und den „künstlichen Erythrozyten“ des Fluids sehr weitgehend.

Nach einer schwachen Verdünnung der Lösung, in der Tropfen der einfachen Fluide schwimmen, mit Wasser treten große Vakuolen in den Tropfen auf, die in diesem Falle an Hefezellen erinnern (vgl. Abb. 4).



Abb. 5. Fluid der Lezitho-
cholesterin-Albumose-
Albumin-Gelatine. Die
Tropfen, die Vakuolen und
Körnchen enthalten, kleben
am Objektträger: „Künst-
liche Infusorien.“

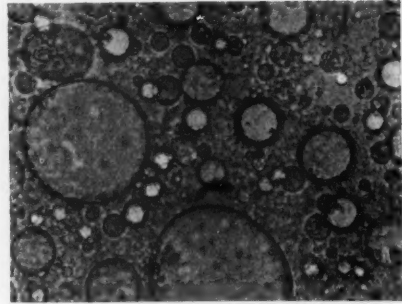


Abb. 6. Wie Fig. 5, doch sind die Fluid-
tropfen zu größeren Flüssigkeitsschichten
zusammengelassen. Stärkere Vergr.: „Kör-
niges Protoplasma einer Infusorie.“

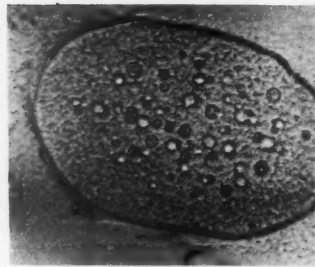


Abb. 7. Bildung des „Ektoplasmas“
bei hohem Gehalt an Lipoiden.
„Künstliche Amöbe.“

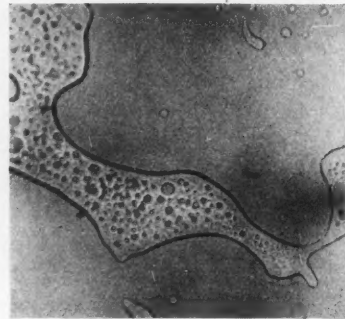


Abb. 8. „Künstliches Plasmodium.“

Die Einführung des Albumins und des Cholesterins in das System der Fluide führt gewöhnlich zur Ausscheidung eines feinkörnigen Niederschlages innerhalb der Fluidtropfen, der aus den entsprechenden Lipoproteiden besteht (so z. B. in den Fluiden II: 1, 2 und 3). In diesem Fall ist das Aussehen der Tropfen und Schichten der Fluide dem des körnigen Protoplasmas sehr ähnlich (vgl. Abb. 5 und 6). Die Tropfen, die Cholesterin

und Äther enthalten, sind homogen, zeigen aber eine reichliche Granulation nach der Verdampfung des letzteren (Ausscheidung des Cholesterinproteids).

Wurde ins Fluid mehr Lezithin und Cholesterin eingeführt, wurde z. B. auf 5 cm³ 10%ige Albumoselösung und 2 cm³ 10%ige Gelatine 4 cm³ 2%ige alkoholische Lezithinlösung genommen, die 0,01 g Cholesterin enthielt, und das Gemisch mit dem Ätherüberschuß (9 cm³) und gleichem Volumen Sulfosalizylsäure vermischt, so hatten die Fluoidtropfen eine verdichtete Oberflächenschicht, die an das „Ektoplasma“ erinnerte; aus dieser Schicht traten die Vakuolen in das Tropfeninnere aus (vgl. Abb. 7). Flossen die Tropfen zusammen, so sah die sich bildende Flüssigkeitsschicht wie ein Plasmodium der Myxomyzeten aus (vgl. Abb. 8 und 9). Wie in diesem hatte das „Ektoplasma“ auch im Fluid eine veränderliche Dicke.

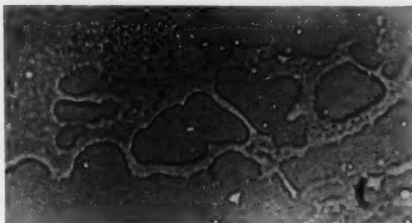


Abb. 9. „Künstliches Plasmodium.“

Wurde zur Darstellung des Fluids eine alte Albumoselösung verwendet (5 cm³ geschmolzener 10%iger Gelatine, 10 cm³ 10%iger Albumose, 0,05 g Eialbumin, 4 cm³ 2%iger Lezithin und 0,01 g Cholesterin), so schied sich in

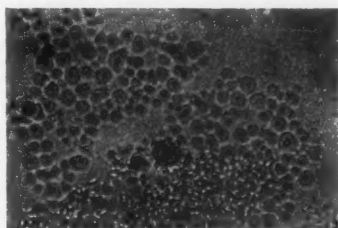


Abb. 10. „Einkernige Zellen.“

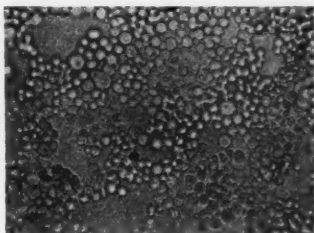


Abb. 11. „Einkernige Zellen.“

den Fluoidtropfen, statt zahlreicher Körnchen, nur ein einziger „Kern“ in jedem Tropfen aus, so daß derselbe an eine einkernige Zelle lebhaft erinnerte (vgl. Abb. 10 und 11).

Die Bildung des „Ektoplasmas“ wurde auch im einfachen Fluid aus Albumose und Lezithin beobachtet (auf 6 cm³ 10%ige Albumose kamen 3 cm³ 4%ige alkoholische Lezithinlösung). Das Gemisch wurde einige Tage stehen gelassen und, nachdem es sich in zwei Schichten geteilt hatte, wurde die obere fast klare Lösung mit gleichem Volumen 4%iger Sulfosalizylsäure vermischt und die Flüssigkeit bis auf 40° C erhitzt. Nach dem Abkühlen schieden sich die Fluoidtropfen aus, die nach 3 Wochen gallertartig erstarrten. Nach dieser Zeit wurde die Lösung mit dem Fluid wieder erhitzt und abgekühlt. Nach zwei Tagen zeigten die Fluoidtropfen ein deutliches

„Ektoplasma“: die Vakuolen sammelten sich in der Tropfenmitte (vgl. Abb. 12).

Die morphologische Ähnlichkeit zwischen dem Protoplasma und den Fluiden der Lipoproteide kommt auch bei der Einwirkung giftiger Sub-

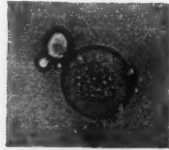


Abb. 12. „Ektoplasma“ im einfachen Fluid: Vakuolen in der Tropfenmitte.

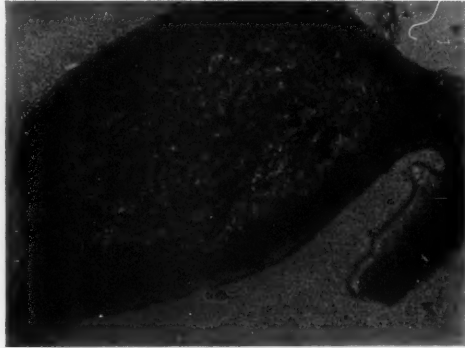


Abb. 13. Fixierung (Koagulation) durch Sublimat beginnt an der Tropfenoberfläche.

stanzen auf beide Systeme zum Ausdruck. Die am meisten verwendeten Fixierungsmittel, wie Sublimat und Alkohol, wirken nicht nur auf das Protoplasma, sondern auch auf die Fluide, die Gelatine oder Albumin ent-



Abb. 14. Wirkung von Alkohol. Bildung der Oberflächenhaut.

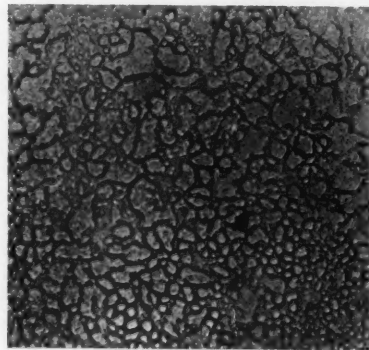


Abb. 15. Pseudowabige Struktur nach der Wirkung des Sublimats.

halten (z. B. auf das Fluid II, 5) fixierend, d. h. koagulierend und verfestigend. In Abb. 13 ist z. B. die Wirkung von Sublimat und in Abb. 14 diejenige von Alkohol auf große Fluidtropfen zu sehen. In beiden Fällen beginnt die feine Koagulation von der Oberfläche des Tropfens und verbreitet sich allmählich auf die ganze Fluidmasse. Bei der Wirkung des Alkohols ist außerdem die Bildung einer Oberflächenhaut zu sehen, die

zurückbleibt, während die Fluoidensubstanz entwässert wird und schrumpft. In gemischten Fluiden, z. B. im Fluid II, 3, können unter der Einwirkung des Sublimats oft pseudowabige Strukturen entstehen (vgl. Abb. 15). Die Mikrophotographie 15 ist den Abbildungen ähnlich, die Bütschli (1892) zur Demonstration der Schaumstruktur des Protoplasmas anführt. Enthält das gemischte Fluid Gelatine, die bekanntlich bei der Erstarrung fadenförmige Mizell-Aggregate bildet (vgl. Lepeschkin 1943 b), so können unter der Einwirkung der Erwärmung und von Wasser auch Fadenstrukturen entstehen (vgl. Abb. 16). Eine 3,4%ige Kalziumchloridlösung rief in den Tropfen des Fluids, das aus Lezithalbumose, Lezithogelatine und Cholesterin bestand, eine Vakuolisierung und Bildung eines Niederschlags hervor, der eine faserige Struktur hatte, was auf die Anwesenheit der fadenförmigen Mizell-Aggregate der Gelatine hinwies.



Abb. 16. Fadenstrukturen beim Auflösen der Fluide in Wasser.

B. Physikalische Eigenschaften

Der Aggregatzustand der Fluide der Lipoproteide hängt vielfach von ihrer Zusammensetzung ab. Enthalten sie z. B. Gelatine, so erstarren sie bei Zimmertemperatur in einigen Stunden gallertartig. Erwärmen macht sie aber wieder flüssig. Eine größere Lezithin- oder Cholesterinmenge vergrößert, wie oben erwähnt, die Viskosität der Fluide und führt zur Ausbildung verdichteter Oberflächenschichten. Später wird die Wirkung der Elektrolyte auf die Lezithalbumose ausführlich beschrieben. Hier sei nur darauf hingewiesen, daß der unter dem Einfluß der Salze in den Fluidtropfen sich bildende Niederschlag zunächst in der Tropfenmitte ausgeschieden wird, während

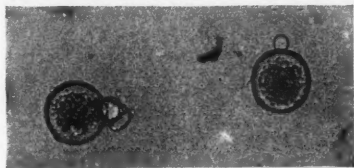


Abb. 17. Bildung des Niederschlags im Tropfeninneren. „Ektoplasma.“

das visköse „Ektoplasma“ hyalin bleibt, weil jede Koagulation durch die große Viskosität des Mediums behindert wird (vgl. Lepeschkin 1926 b) (vgl. Abb. 17). Das Ektoplasma enthält bekanntlich keine Körnchen auch in der lebenden Zelle. Andererseits kann das Ektoplasma sowohl in der Zelle als auch in den Fluidtropfen fehlen (vgl. Abb. 5 und Lepeschkin 1926 a).

Bei einer Verdünnung der die Fluidtropfen umgebenden Lösung mit Wasser saugen diese Wasser auf und ihr Volumen nimmt zu. Da die das

Fluoid bildenden Mizellen sich nur allmählich wieder mit Wasserhüllen umgeben, so kommt es gewöhnlich vor, daß in verschiedenen Teilen der Fluoidtropfen die Mizellen nicht gleichzeitig auseinandergehen und sich im aufgesogenen Wasser lösen, so daß in den Tropfen Vakuolen entstehen. Beim weiteren Aufsaugen des Wassers gehen aber die meisten Mizellen in Lösung, die Vakuolen verschwinden und die Tropfen werden gelöst. Wird aber Wasser zu rasch aufgesogen oder ist die Viskosität des Fluoids zu hoch, so bilden sich keine Vakuolen und die Tropfen verblassen und lösen sich einfach. Eine analoge Erscheinung wird bekanntlich auch am Protoplasma von Meerestieren und Pflanzen beobachtet, wenn es mit verdünntem Meerwasser in Berührung kommt (vgl. Lepeschkin 1925, 1926aa): Wasser wird durch das Protoplasma aufgesogen und in ihm entstehen Vakuolen. Die Auflösung desselben findet aber gewöhnlich nicht statt, weil die Ober-

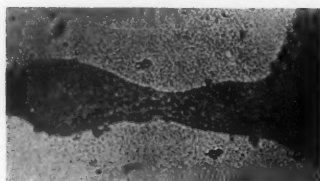


Abb. 18. Rückstand (Koagulat) nach dem Auflösen des Fluoidtropfens beim Verdünnen der umgebenden Lösung (5 ccm Albumose, 2 ccm Gelatine, 0,03 g Albumin, 3 ccm 2% Lezithin, 0,01 g Cholesterin).

flächenschicht des Protoplasmas infolge einer zu raschen Deformierung koaguliert (Lepeschkin 1939). Ist aber das Protoplasma gegen mechanische Schädigungen wenig empfindlich, wie z. B. das aus den *Chara*-Zellen ausgetretene Protoplasma, so löst es sich nach der Verdünnung der umgebenden Lösung auf (Umrath 1935, Lepeschkin 1939). Es soll noch erwähnt werden, daß die gallertartig erstarrten Fluide (bei genügend großen Gelatine- und Lipidgehalt, oder altes Lezitalbumose-Fluid, oder Lezithohämoglobin-Fluid) bei der Verdünnung der umgebenden

Lösung mit Wasser, wie auch erstarrtes Protoplasma, nicht gelöst werden. Die Ähnlichkeit zwischen den beiden Arten der kolloiden Systeme (den Fluiden und dem Protoplasma) kommt auch darin zum Ausbruch, daß beide beim Auflösen der Körnchen hinterlassen, die nicht gelöst werden (für das *Chara*-Protoplasma hat dies Umrath beobachtet, a. a. O.). Aber auch eine Art der Koagulation kann bei der Wirkung des Wassers auf Fluide beobachtet werden, die an diejenige des Protoplasmas erinnert. Die entstehenden Körnchen können dabei so dicht gelagert sein, daß ihre Masse fast das Volumen des Tropfens ausfüllt, wie es in Abb. 18 zu sehen ist.

In meiner Kolloidchemie des Protoplasmas habe ich keinen besonderen Wert darauf gelegt, ob das flüssige Protoplasma mit wässerigen Lösungen oder mit reinem Wasser nicht mischbar ist. Hier soll aber betont werden, daß das flüssige Protoplasma, wie Fluide der Lipoproteide, nur mit Lösungen von einer Konzentration, die derjenigen der unter normalen Verhältnissen das Protoplasma oder das Fluid umgebenden Lösung nicht stark nachsteht, nicht mischbar ist. Im speziellen Fall bei Wasserpflanzen, z. B. bei *Chara*, ist unter dieser Konzentration nicht die des umgebenden Wassers, sondern die Zellsaftkonzentration zu verstehen. Das Protoplasma dieser Pflanze ist in einer 6%igen Zuckerlösung scharf abgegrenzt, verliert aber

die Abgrenzung bei der Verdünnung derselben (Lepeschkin 1939). Fauré-Fremiet (1933) betont, daß das Protoplasma von Oozyten und Eiern der Meertiere nicht im Meerwasser, sondern in destilliertem Wasser löslich ist. Derselbe Forscher gibt ebenfalls an, daß das Zytoplasma der Eier von *Raja Batis* nach der Auflösung in Wasser, durch konzentriertes Ammoniumsulfat oder Alkohol niedergeschlagen werden kann. Somit ist es in dieser Beziehung den Fluiden der Lipoproteide ähnlich.

Die Erwärmung bis 40° und 50° führt, wie die Wasseraufnahme, zur Vakuolisierung der Fluide der Lipoproteide und weiter zum Verschwinden der Vakuolen und der Auflösung der Fluidtropfen, die nach der Abkühlung wieder erscheinen. Bei gemischten Fluiden (z. B. bei II, 5) bleiben nach der Auflösung der Tropfen Körnchen (oder Kerne) zurück. Was nun das flüssige Protoplasma anlangt, so kommt dessen Auflösung beim Erwärmen nicht in Frage, weil bei hoher Temperatur eine Koagulation und Erstarrung des Protoplasmas eintritt, obwohl eine Vakuolisierung beim Erwärmen des Protoplasmas mehrfach beobachtet wurde (vgl. die Literatur bei Lepeschkin 1937).

Bei der giftigen Neutralsalzwirkung auf Protoplasma sind die gleichen Ionen die aktivsten, die in den Fluidtropfen der Lipoproteide einen Niederschlag am leichtesten hervorrufen. Da aber die giftige Salzwirkung mit der Koagulation im Protoplasma zusammenhängt (Lepeschkin 1937, S. 132), so ist die Ionenwirkung auf beide Arten der kolloidalen Systeme ähnlich².

Wurden Salze zu der das Fluid der Lezithalbumose (I, 2) umgebenden Lösungen zugesetzt, so rief Natriumsulfat auch bei der Sättigung keinen Niederschlag in den Fluidtropfen hervor, während Natriumchlorid ihn bei der Sättigung und Natriumrhodanat schon bei verhältnismäßig schwacher Konzentration hervorruft. Andererseits rief Kaliumchlorid keine Koagulation in den Tropfen auch bei Sättigung hervor, während Kaliumbromid sie bei Sättigung und Kaliumjodid bei einer kleinen, aber etwas größeren Konzentration als Kaliumrhodanat verursachte. Litiumsalze waren unwirksam. Die Ionenreihen mit der zunehmenden Fähigkeit eine Koagulation in den Fluidtropfen hervorzurufen waren die folgenden: Na, Li < K, NH₄ < Ca und SO₄ < Cl < Br < J < CNS. Dieselben Reihen sind auch für das Protoplasma bekannt, obwohl Ca-Salze gewöhnlich ungiftiger als Alkalisalze sind. Die Ursache davon liegt in einer geringen Permeabilität des Protoplasmas für Ca-Salze. Ist aber dasselbe für Ca-Salze permeabel, so sind diese Salze noch giftiger als Alkalisalze (Literatur bei Lepeschkin 1937 und 1938b). Eine analoge Erscheinung wird auch bei der Einwirkung von CaCl₂ auf das Fluid der Lezithalbumose beobachtet. Wurde eine 3,7%ige Lösung dieses Salzes am Rande des mikroskopischen Präparats der Fluidtropfen zugesetzt, so wurde eine Haut an der Tropfenoberfläche gebildet; da aber das Wasser infolge der Zerstörung des Gleichgewichts des Systems von den Tropfen aufgesaugt wurde, so platzte die Haut, und CaCl₂ drang

² Die einschlägige Literatur über die Salzwirkung auf Protoplasma ist in meiner Kolloidchemie des Protoplasmas zu finden (1938b).

in das Tropfeninnere ein und bildete einen körnigen Niederschlag in demselben.

Der letzte Versuch zeigt, daß die Bildung der Haut an der Fluiddoberfläche das Eindringen des Kalziumchlorids in die Tropfen hindert, so daß anzunehmen ist, daß die Permeabilität des Fluids für CaCl_2 gering ist. Daß Wasser in die Tropfen leicht eindringt, zeigt eine sofortige Vakuolisierung derselben bei der Verdünnung der umgebenden Lösung. NaCl dringt aber in die Tropfen viel langsamer ein, was aus dem folgenden Versuch zu ersehen ist. In der das Fluid umgebenden Lösung wurde NaCl gelöst und nach einiger Zeit wurde am Rande des mikroskopischen Präparats Wasser zugesetzt. Das Volumen der Tropfen nahm viel bedeutender zu als in dem Falle, wenn vorher kein Salz zugegeben war. NaCl blieb also in den Tropfen und entwickelte einen osmotischen Druck in ihrem Inneren. Noch weniger dringt Rohrzucker in die Tropfen ein. Wurde z. B. 30%iger Zucker in der das Fluid umgebenden Lösung gelöst, so verschwanden alle Vakuolen in den Fluiddropfen und diese wurden vollkommen homogen, wenn sie nur Lezithin und Albumose enthielten. Das Wasser der Fluiddropfen wurde von Zucker dermaßen entfernt, daß die Tropfen gallertartig erstarrten.

Zum Schluß soll noch das Verhalten der Fluide der Lipoproteide und des Protoplasmas gegen Anilinfarbstoffe verglichen werden. Das Fluid der reinen Albumose (abgesetzt aus Albumoselösungen durch Sulfosalizylsäure oder Ammoniumsulfat, also in saueren oder alkalischen Lösungen) speichert Anilinfarbstoffe unabhängig von der Reaktion der umgebenden Lösung sehr stark. Fluide der Lezithalbumose und anderer Lipoproteide werden dagegen nur in dem Falle durch Methylenblau und Neutralrot (zugesetzt zu der umgebenden Lösung) merklich gefärbt, wenn sie wenig Lipide enthalten (z. B. auf 1 Volumen 10%iger Albumose 0,1 Volumen 4%ige Lezithinlösung). Aber auch in diesem Falle ist die Färbung der nach der Auflösung der Fluiddropfen in Wasser zurückbleibenden Körnchen nur sehr schwach. Enthält aber das Fluid viel Lipide (z. B. auf 1 Volumen Albumose 0,5 Volumen Lezithinlösung), so speichern die Fluiddropfen die Farbstoffe gar nicht und werden durch diese nur sehr schwach gefärbt³. Eosin färbte sie überhaupt nicht. Wurde eine 0,01%ige Methylenblaulösung in Wasser am Rande des mikroskopischen Präparats des Fluids (vgl. S. 340, Fluid II, 3) langsam zugesetzt, so färbten sich die Tropfen zunächst gar nicht; nachdem aber unter der Einwirkung des Wassers Vakuolen in denselben entstanden waren, färbten sich die Tropfen. Nicht selten wurden dabei Oberflächenhäute ausgebildet, die infolge der Wasseraufsaugung durch die Tropfen platzten, wobei der Tropfeninhalt herausfloß. Das Methylenblau färbte in diesem Falle nicht nur die Oberfläche, sondern auch das Tropfeninnere, die ausgetretenen Körnchen mit einbegriffen. Das le-

³ Werden die Fluiddropfen mit Farbstoffkriställchen (Methylenblau, Neutralrot) gemischt, so färben sich die in der Nähe der Kriställchen befindlichen Tropfen. In diesem Falle ist eine chemische Reaktion zwischen dem Farbstoff und Proteinen anzunehmen.

bende und unbeschädigte Protoplasma wird bekanntlich, durch basische Farbstoffe in neutralen oder schwach sauren Lösungen nicht gefärbt. Nach der Einwirkung verschiedener schädlicher Bedingungen, deren schädliche Wirkung noch so schwach sein kann, daß sie keine morphologischen Veränderungen in den Zellen hervorruft, kann aber die lebende Materie durch Anilinfarbstoffe schwach gefärbt werden (vgl. die Literatur: Lepeschkin 1937, 1838b, auch: Herčík 1928, Kiszely 1939, Zweigbaum 1939; Micholovski 1939, Pirson und Alberts 1941, Küster 1940 u.a.). Da bei der Schädigung des Protoplasmas Wasser von demselben aufgenommen wird, wobei sehr oft Vakuolen in seinem Inneren erscheinen, so wird die Färbung des lebenden Protoplasmas (nach der Schädigung) und der Fluide der Lipoproteide (nach der Vakoulisierung) wahrscheinlich durch die Hydrationsverstärkung hervorgerufen, die zu einer Auseinanderschlebung der Fluoidmizellen führt und dadurch das Eindringen des Farbstoffes begünstigt. Daß das Aufnehmen des Wassers durch das lebende Protoplasma seine Vitalfärbung begünstigt, beweisen direkte Versuche (vgl. Zweigbaum a. a. O., Großfeld 1938). Die Ähnlichkeit der beiden kolloiden Systeme äußert sich auch darin, daß beide besonders leicht nach der Fixierung gefärbt werden. Merkwürdig ist, daß, in dem Falle, wenn statt zahlreicher Körnchen nur ein einziger Kern in jedem Tropfen beobachtet wird (vgl. Abb. 10 und 11), er nach der Fixierung mit Alkohol durch Methylenblau stärker als die übrige Tropfenmasse gefärbt wird (vgl. Abb. 19).

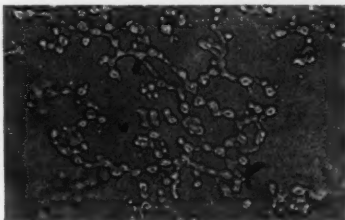


Abb. 19. „Einkernige Zellen“ nach Fixierung und Färbung.

Zusammenfassung

Nach der Festsetzung der kolloidchemischen Nomenklatur, die in der Arbeit Verwendung findet, wurde eine kritische Übersicht der vorhandenen Theorien der Protoplasmastruktur gegeben.

Die alten Theorien der morphologischen Struktur des Protoplasmas von Frommann, Flemming und Altmann betrachteten nur temporär entstehende Protoplasmaeinschlüsse oder grobe Strukturen, die oft durch unlebende Körnchen oder Vakuolen gebildet werden, als den allgemein gültigen Bau der lebenden Materie. Andererseits ist Bütschlis Theorie der Schaumstruktur derselben schon deshalb abzulehnen, weil diese Strukturen mit den flüssigen Eigenschaften des Protoplasmas derselben (Zytoplasmas) nicht vereinbar ist; aus Gas und Flüssigkeit oder aus zwei Flüssigkeiten gebildete Schaumstrukturen besitzen gallertartige Eigenschaften. Zufällig auftretende Schaumstrukturen im Protoplasma sind gewöhnlich durch Nahrungsmaterial oder Vakuolen gebildet. Obwohl das flüssige Protoplasma oft die Struktur einer Emulsion hat (Berthold), können andere Arten der lebenden Materie eine andere Struktur besitzen. Mit Reinkes, Fischer und Růžicka

haben wir also anzunehmen, daß mikroskopische Protoplasmastrukturen im allgemeinen polymorph sind und daß es keine einheitliche morphologische Struktur der lebenden Materie geben kann. Wenn von einer Struktur des Protoplasmas überhaupt die Rede sein soll, kann diese nur kolloidchemischer Natur sein. Im speziellen Fall, wenn das Protoplasma flüssig ist, erscheint es unter dem Mikroskop als eine grobe Emulsion oder zugleich auch als eine Suspension und besitzt außerdem die Eigenschaften einer hydrophilkolloiden Lösung.

Die in letzter Zeit gemachten Versuche, eine Theorie einer einheitlichen submikroskopischen Struktur der lebenden Materie zu geben, indem in allen Arten derselben ein Gerüst aus verwachsenen Polypeptidketten angenommen wurde (Seifriz, Frey-Wissling), scheiterten in Anwendung auf das flüssige Protoplasma, weil diese Theorie den bekannten kolloidchemischen Tatsachen widerspricht. Das flüssige, fließende Protoplasma kann in keinem Fall ein solches Gerüst besitzen, weil die Entstehung der Brücken zwischen fadenförmigen Molekülen oder Mizellen immer zur Erstarrung eines kolloiden Systems führt. Diese Struktur könnte nur totes und erstarrtes Protoplasma haben. Die einzig mögliche Struktur des flüssigen Protoplasmas ist seine Fluidstruktur.

Da die Grundsubstanzen der lebenden Materie (Vitale) Komplexe von Eiweißkörpern, Lipoiden und anderen Substanzen darstellen, wurden, in der dargelegten Arbeit, Fluide der einfachsten Lipoproteide künstlich hergestellt und ihre morphologischen und physikalischen Eigenschaften mit denjenigen des Protoplasmas verglichen. Diese Eigenschaften sind bei den Fluiden aus Lezithin, Cholesterin, Albumose, Eialbumin, Gelatine und Oxyhämoglobin denjenigen des Protoplasmas ähnlich.

Literatur

- Adams, N., 1930, The physical chemistry of surfaces. London.
 Astbury, W. and Lomax, R., 1935, J. chem. Soc. (London), Juni H. 846.
 Berthold, 1886, Studien über Protoplasma-mechanik. Leipzig.
 Boehm, G., 1935, Bioch. Z. 282, 32.
 Bungenberg de Jong und Mitarbeiter, 1932, Protoplasma 15, 110. Dieselbe Zeitschr., 1932—1938.
 — 1932, Biochemische Ztschr. 248, 131, 335. Dieselbe Zeitschr., 1932—1938.
 Bütschli, 1892, Untersuchungen über mikroskopische Schäume und Protoplasma. Leipzig.
 Chinn, 1937, 1938, Zitiert nach Schmidt (1940), S. 63.
 Derjaguin, B., 1933, Kolloid-Z. 64, 1.
 Dervichian, 1941, C. r. Acad. Sc. Paris 212, 8.
 Fauré-Fremiet, E., 1929, Protoplasma 5, 321.
 — 1933, Protoplasma 19, 62.
 Fischer, A., 1899, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena.
 Fowell, R., 1936, J. R. Micr. Soc. 56, 12.
 Frey-Wyssling, A., 1938, Protoplasma-Monographien 15, Borntraeger, Berlin.
 Freundlich, H., 1927, Protoplasma 2, 278.
 Gicklhorn, J. und Möschl, L., 1930, Protoplasma 9, 521.
 Giersberg, H., 1922, Arch. Entw.-Med. 51, 150.
 Grossfeld, 1938, Ber. Physiol. 112, 546.

- Haurowitz, 1935, 1936, Kolloid-Z. 71, 198, 74, 208, 77, 65.
 Heilbrunn, 1928, Protoplasma-Monographien 1. Borntraeger, Berlin.
 Herčík, F., 1938a, Protoplasma 31, 228.
 — 1938b, Radiologia 3, 5.
 Kiszely, 1939, Ber. Physiol. 120, 97.
 Kroepelin, 1929, Ber. deutsch. chem. Ges. 62, 3086.
 Küster, E., 1940, Z. wiss. Mikrosk. 57, 153, 311.
 Lepeschkin, W. W., 1910, 1911, Ber. deutsch. bot. Ges. 28, 323, 29, 187, 247.
 — 1924, Kolloidchemie des Protoplasmas. Springer, Berlin.
 — 1928, Science, New York.
 — 1925, Biologia Gener. 1, 368 und 654.
 — 1926a,aa, Ber. deutsch. bot. Ges. 44, 1, 14.
 — 1926b, 1938a, 1943a, 1944, Kolloid-Z. 39, 41, 85, 52, 105, 144, 107, 131.
 — 1930, 1939, 1943, Protoplasma 9, 269; 33, 1; 37, 404.
 — 1937, Protoplasma-Monographien 12, Borntraeger, Berlin.
 — 1938b, Kolloidchemie des Protoplasmas, II. Aufl. Steinkopff, Dresden.
 — 1926c, 1943b, Bioch. Z. 171, 126, 314, 356.
 Linsbauer, K., 1932, Sitz-Ber. Ak. Wiss. Wien, Math. Kl., I. Abt. 141, 1.
 Lynen, F., 1938, Kolloid-Z. 85, 259.
 Meyer, E., 1935, C. r. Soc. Biol. Paris 119, 422.
 Michalowski, Ber. Physiol. 112, 594.
 Müller, F. H., 1941a, Kolloid-Z. 96, 326.
 — 1941b, Physik. Z. 42, 123.
 Northen, H., 1936, Bot. Gaz. 98, 421.
 Northrop, J. and Kunitz, M., 1931, J. phys. Chem. 135, 162.
 Ostwald, Wo., 1925, 1927, 1929, Kolloid-Z. 26, 157, 199, 248, 43, 200, 47, 176.
 Pfeiffer, 1941, Protoplasma 35, 264.
 Pirson und Alberts, 1941, Protoplasma 35, 131.
 Przylecki und Hofer, 1936, Bioch. Z. 85, 52.
 Reiner, M., 1931, Kolloid-Z. 54, 175.
 Reinke, J., 1881, Studien über das Protoplasma. Berlin.
 — 1911, Einleitung in die theoretische Biologie. Berlin.
 Rúžicka, 1907, Struktur und Plasma.
 Seifriz, F., 1930, Protoplasma 9, 177.
 — 1928, Arch. exp. Zellforsch. 6, 341.
 — 1935, Physics 6, 159.
 — 1936, Protoplasm. McGraw-Hill, N. Y. u. London.
 — 1942, A Symposium on the structure of protoplasma. The Iowa State College Press.
 Schmidt, W., 1941, Ergebnisse der Physiologie 44, 27.
 — 1940, Protoplasma 34, 252.
 Staudinger, 1932, Hochmolekulare organische Verbindungen. Springer, Berlin.
 — 1940, Organische Kolloidchemie. Vieweg & S., Braunschweig.
 — 1943, Z. Elektroch. 49, 7.
 Strugger, S., 1929, Protoplasma 7, 23.
 Tomita, T., 1934, Fol. Anat. jap. 12, 445.
 Ulrich, H., 1936, Planta 26, 311.
 Umrath, K., 1935, Protoplasma 24, 92.
 Wagner-Jauregg, Th. und Arnold, H., 1938, Bioch. Z. 299, 274.
 Zweibaum, 1939, Ber. Physiol. 116, 205.

Plastiden-Rückverlagerung nach Zentrifugierung¹ und Narkose

Von

Themistokles Diannelidis, Griechenland

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 7. April 1944)

Seit Mercklin (1850) wurde das Problem der Gestalt- und der Lageveränderungen der Plastiden wiederholt untersucht. Bei Senn (1908), Schürhoff (1924), Küster (1927, 1935, 1937) u. a. finden sich diesbezügliche Angaben. Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Objekten (Schimper 1885, Senn 1908, Küster 1911, 1927, Heitz 1937, Peteler 1939 u. a.) stellten eine Formveränderung der Chromatophoren unter der Einwirkung verschiedener Faktoren fest. Viele Algen liefern für solche Untersuchungen ein geeignetes Material, da an ihren Plastiden ein auffallender amöboider Formwechsel wiederholt beobachtet werden konnte. Literaturangaben über solche amöboide Formveränderungen bei Algenchromatophoren finden sich vor allem bei Peteler (1939), Küster (1937) u. a. Nach der Auffassung Senns erfolgt die Verlagerung der Plastiden aktiv durch Formveränderungen der Plastiden und verläuft daher unabhängig von der Plasmaströmung (vgl. Sauvageau 1917). Die Chromatophoren vollziehen nach Senn ihre aktiven Bewegungen innerhalb des Protoplasmas mit Hilfe farbloser plasmatischer Pseudopodien (Peristromium). Die Mehrzahl der Autoren (Küster 1906, 1935, Knoll 1908, Linsbauer und Abramowicz 1909, Guilliermond 1935 u. a.) nimmt jedoch an, daß die Verlagerung der Plastiden passiv durch die Zytoplasmaströmung erfolgt, ohne daß die Formveränderungen der Chromatophoren, die durch Veränderungen der Oberflächenspannung verursacht werden, dabei eine wesentliche Rolle spielen. Küster (1935) schreibt: „In der Frage nach der Mechanik der Plastidenwanderungen ist das letzte Wort noch nicht gesprochen.“

Die vorliegenden Beobachtungen, die an der Alge *Eremosphaera viridis* gemacht wurden, stellen insofern einen Beitrag zur Frage der Plastidenbewegungen dar, als sie sich auf die Rückverlagerung der Chloroplasten nach vorhergegangener Zentrifugierung beziehen. Das Material, das Herr Obermedizinalrat Dr. O. Kopeitzky-Rechtperg mir freundlicherweise

¹ Die sprachliche Revision übernahm Privatdozent Lotte Reuter, wofür ich herzlichst danke.

zur Verfügung stellte, stammte von einer Moowiese vom Seeufer bei Hallstatt im Salzkammergut. Während der Untersuchungen wurde das Material im Standortwasser im Kalthaus des Wiener Institutes gehalten.

Über *Eremosphaera viridis* De By. berichtet Chodat (1895) folgendes: „... Wenn die Alge vollkommen entwickelt ist, hat sie die Form einer großen Kugel (diam. 100–150 μ). Die Zellhaut ist dünn und läßt sich nicht durch ammoniakhaltiges Kongorot färben, wohl aber ihr innerer Belag. In der Mitte befindet sich ein großer Zellkern ... Von der Protoplasmatasche, die den Kern umgibt, laufen Plasmastränge oder Lamellen nach der Peripherie und verbinden so dieselbe mit dem wandständigen Protoplasma-belag ... In dem letzteren bemerkt man zahlreiche Chromatophoren, welche von außen gesehen den Eindruck von mehr oder weniger eckigen oder unregelmäßig zerschlitzen Scheiben oder spindelförmigen Körpern machen. Von ihrer Mitte aus verlängern sich diese Platten nach innen in einem gewöhnlich kurzen konischen oder nach zwei oder drei Richtungen geflügelten Fortsatz, was den Chromatophoren, von außen gesehen, einen verschieden geformten zentralen oder exzentrischen dunkleren Fleck verleiht. Alle diese Chromatophoren sind durch dichtere netzförmig angeordnete Protoplasmastränge verbunden. In ihrem Inneren kommt immer ein ziemlich großes Pyrenoid vor, welches durch angehäuften Stärkekörner bedeckt werden kann.“

Was den Einfluß des Lichtes auf die Anordnung und die Lageveränderung der Chromatophoren betrifft, so stellte Senn (1908) bekanntlich auf Grund der markanten Erscheinungen bei *Eremosphaera* einen eigenen *Eremosphaera*-Typus auf: die zahlreichen Chromatophoren der annähernd gleichachsigen freilebenden Zellen vollziehen ihre Wanderungen außer im Wandbelag auch in den zum zentral gelegenen Kern führenden Plasmasträngen.

Bei meinen Untersuchungen wurde das Material zentrifugiert und die Rückverlagerung der Plastiden einerseits in Standortwasser, andererseits nach Behandlung mit Ätherwasser beobachtet.

1. Rückverlagerung der Chloroplasten nach bloßer Zentrifugierung

Das Versuchsmaterial wurde im Zentrifugenröhrchen in einer elektrischen Zentrifuge (Radius = 15 cm) bei einer Tourenzahl von 3000 Umdrehungen in der Minute durch 7, 10 und 15 Minuten zentrifugiert. Bei allen Versuchen zeigten die Zellen von *Eremosphaera* eine vollständige Verlagerung der Chloroplasten an den zentrifugalen Pol der Zelle. Bei der Zentrifugierung bleiben sämtliche Zellen am Leben, *Eremosphaera* kann also zu den Zelltypen gerechnet werden, die das Zentrifugieren vertragen (Mottier 1899, Andrews 1903, 1915, Höfler 1936). Abb. 1a zeigt eine *Eremosphaera*, die durch zehn Minuten bei 3000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert wurde. Die Chloroplasten sind an den zentrifugalen Pol verlagert, wo sie eine dicke, schwarzgrüne Kappe bilden; auch bedeutende Mengen des Zytoplasmas erfahren gemeinsam mit dem Zellkern eine Verlagerung in derselben Richtung. An den Zellwänden bleibt ein dünner Plasmabelag

erhalten, von dem aus Plasmastränge zu dem am zentrifugalen Pol der Zelle angehäuften Zytoplasma verlaufen. Die Verlagerung der Chloroplasten infolge der Zentrifugierung erfolgt so vollständig, daß sich nur äußerst selten in diesen Zytoplasmasträngen nach der Zentrifugierung noch vereinzelt Chromatophoren beobachten lassen. Die zahlreichen in der Zelle enthaltenen Öltröpfchen sammeln sich infolge ihres geringen spezifischen Gewichtes am zentrifugalen Pol der Zelle an (Abb. 2) oder bleiben in den Plasmasträngen eingebettet (Abb. 1 a).

Nach der Zentrifugierung wurde das Versuchsmaterial bei diffusem Licht in vollkommener Ruhe gehalten und nach Ablauf bestimmter Zeitintervalle an vielen Zellen der Fortgang der Rückverlagerung beobachtet. Schon kurze Zeit nach der Beendigung der Zentrifugierung setzt die Rückverlagerung der Chloroplasten ein (Abb. 1 b), die nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde ziemlich weit gediehen ist und nach 2, längstens 4 Stunden vollständig vollzogen ist. Auch der Kern nimmt wieder seine ursprüngliche Lage in der Zelle ein². Der ganze Zellinhalt weist nach Ablauf der angegebenen Zeit wieder eine vollständig normale Anordnung auf. Die Rückwanderung der Chloroplasten erfolgt sowohl im plastischen Wandbelag als auch in den Plasmasträngen. Verglichen mit *Spirogyra* oder *Closterium* erfolgt also die Wiederherstellung des situs nach der Schleuderung bei *Eremosphaera viridis* besonders rasch (Höfler 1942).

Infolge der kurzen Zeit, die die Rückverlagerung der Plastiden bei dem verwendeten Material beansprucht, war es mir möglich, den ganzen Vorgang an ein und derselben Zelle unter dem Mikroskop zu verfolgen. Dabei mußte danach getrachtet werden, die Zelle während der ganzen Beobachtung in derselben Lage zu erhalten, da die Zellen im allgemeinen die Tendenz zeigen, den Pol, an den die Chloroplasten angehäuft sind, infolge der Wirkung der Schwerkraft nach unten zu verlagn. Fig. 1 zeigt den Ablauf der Rückverlagerung der Chloroplasten, wie er in einer Zelle fortlaufend innerhalb von 2 Stunden beobachtet werden konnte. Die Art und Weise, in der die Rückwanderung der Plastiden erfolgt, erweckt den Eindruck, daß diese Rückverlagerung passiv verläuft. Die Form der Plastiden bleibt unverändert und niemals konnte ich während des geschilderten Vorganges Pseudopodien oder im allgemeinen Formveränderungen an den Plastiden feststellen (vgl. Senn 1908, S. 294). Die Plastiden behalten die von Chodat (1895) als charakteristisch beschriebene Form bei.

2. Rückverlagerung der Plastiden nach Zentrifugierung und nachträglicher Ätherbehandlung

Es ist bekannt, daß die durch Veränderung der Belichtungsverhältnisse hervorgerufene Chromatophorenverlagerung durch chemische Faktoren infolge ihrer schädigenden Wirkung auf die Chromatophoren oder durch Aufheben der Lebenstätigkeit der ganzen Zelle gehindert wird (Schürhoff 1924). Äther hemmt von einer bestimmten Konzentration an die Chromato-

² Die Lage des Kernes wurde sowohl vor als auch nach der Zentrifugierung an mit Karminessigsäure gefärbtem Material festgestellt.

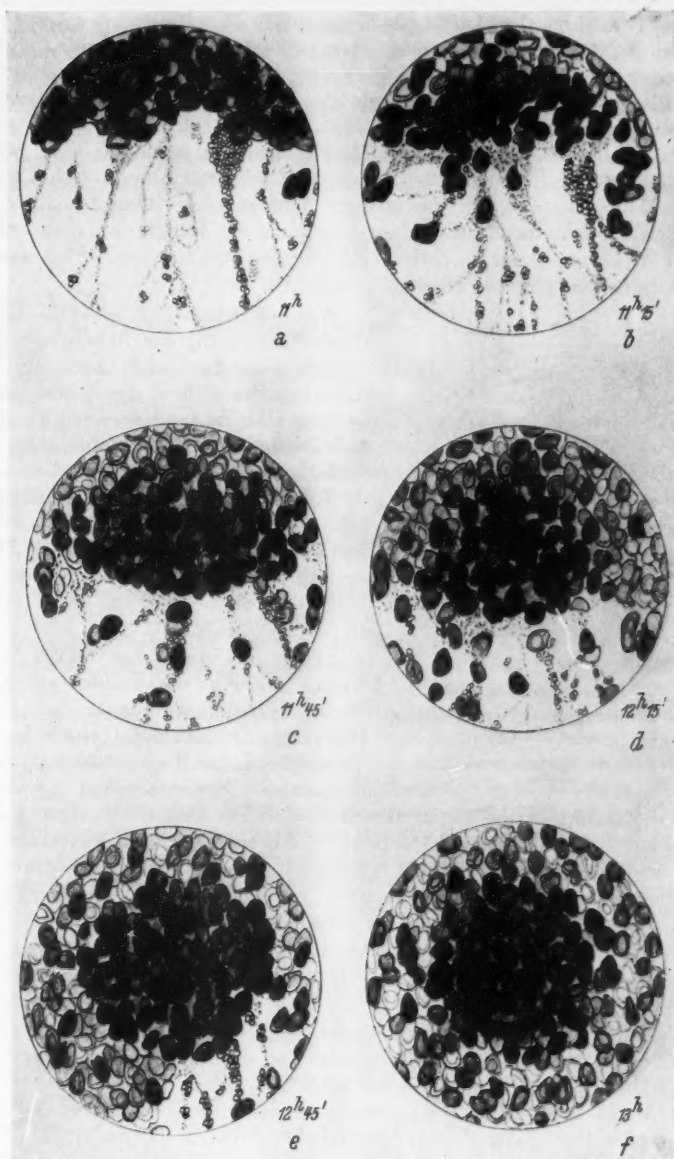


Abb. 1. Verlauf der Rückverlagerung der Chloroplasten nach Zentrifugierung.

phorenbewegungen (Elfving 1886, Senn 1908, Linsbauer und Abramowicz 1909, Schürhoff 1924 u. a.).

Bei den weiteren Versuchen mit *Eremosphaera* wurden die zentrifugierten Zellen mit 0,5%, 1% und 2% Ätherwasser behandelt. Die Herstellung der verschiedenen Konzentrationen erfolgte durch Verdünnung einer Ätherstammlösung mit Standortwasser. Die Zentrifugenröhrchen, in denen sich die Zellen befanden, wurden sorgfältig verschlossen gehalten; nach Ablauf von bestimmten Zeitintervallen wurde die Lage der Chloroplasten kontrolliert. Dabei zeigte es sich, daß sich die Wirkung des Äthers bei allen verwendeten Konzentrationen in einer Hemmung der Rückverlagerung äußert, da in Ätherwasser in den Zellen noch nach 24 Stunden keine Rückverlagerung der Chloroplasten erfolgte.

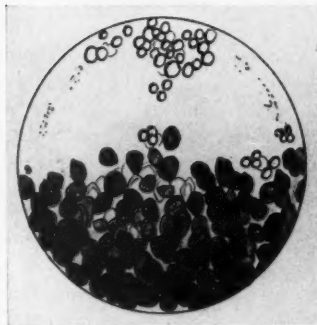


Abb. 2. *Eremosphaera viridis* nach Zentrifugierung und Behandlung mit 2% Ätherwasser. Die Plasmastränge sind zerrissen.

Wurden jedoch nach einer 2–4stündigen Einwirkung des Ätherwassers die Röhrchen geöffnet und durch die Verdunstung des Äthers die Zellen wieder in normalen Zustand versetzt, so zeigte sich folgendes: Bei der Behandlung mit 0,5%, bzw. 1% Ätherwasser kehrt, wenn die Objekte unter normale Bedingungen gebracht werden, die Verlagerungsfähigkeit der Chloroplasten zurück. Die Rückverlagerung erfolgt jedoch wesentlich langsamer. Sie beansprucht eine Zeit von 10 bis 20 Stunden.

Durch die Einwirkung von 2% Ätherwasser werden die Zellen jedoch so stark geschädigt, daß sich nach Überführung der Zellen in normale Bedingungen keine Rückverlagerung mehr beobachten läßt. Vereinzelt abwei-

chende Ergebnisse, die darin bestehen, daß in einigen wenigen Fällen nach einer Behandlung mit 0,5%, bzw. 1% Ätherwasser die Rückverlagerung nicht vollständig oder gar nicht erfolgt, lassen sich durch Unterschiede im physiologischen Zustand der einzelnen Zellen erklären. Es ist bemerkenswert, daß sich die Wirkung von 2% Ätherwasser in der Mehrzahl der Fälle in einem Zerreißen der Plasmastränge äußert (Fig. 2). Ausnahmsweise läßt sich auch dieselbe Beobachtung nach Behandlung mit 0,5% oder 1% Ätherwasser machen.

Was die Wirkung der Ätherlösung auf die Rückverlagerung der Plastiden betrifft, so ließe sich daran denken, daß die Narkotika in erster Linie die Viskosität des Protoplasmas beeinflussen werden. Lepeschkin (1938) führt Angaben dafür an, daß schwache Konzentrationen in vielen Fällen eine Verminderung der Plasmaviskosität hervorrufen. Germ (1932, 1933 a, 1933 b), der nach Narkose eine Beschleunigung der Plasmasystrophe beobachten konnte, vertritt die Auffassung, daß die Geschwindigkeit, mit der die Systrophe erfolgt, weitgehend und in erster Linie vom Viskositätswider-

stand des zu verlagernden Protoplasmas abhängig ist. Da die Herabsetzung der Viskosität offenbar die Widerstände im Protoplasma vermindert, so ließe sich die verzögerte Rückverlagerung der Chloroplasten bei Behandlung mit Narkotika nicht erklären. Die Deutung der Beobachtung kann nur darin bestehen, daß nicht der Mechanismus, sondern die aktive Leistung des Protoplasmas durch den Äther beeinflusst wird und daß der Rückverlagerungsvorgang daher als ein aktiver Vorgang des lebenden Protoplasmas angesehen werden muß, der durch Narkose in reversibler Weise zeitweilig ausgeschaltet wird.

Literatur

- Andrews, F. M., 1903, Die Wirkung der Centrifugalkraft auf Pflanzen. Jahrb. wiss. Bot. 38, S. 1—40.
- 1915, Die Wirkung der Centrifugalkraft auf Pflanzen. Jahrb. wiss. Bot. 56, S. 221.
- Chodat, R., 1895, Über die Entwicklung der *Eremosphaera viridis* de By. Bot. Zeitg. 53, S. 137—142.
- Elfving, F., 1886, Über die Einwirkung von Äther und Chloroform auf die Pflanzen. Finska Vetenska Soc. Förhandl. 28.
- Germ, H., 1932, Untersuchungen über die systrophische Inhaltsverlagerung in Pflanzenzellen nach Plasmolyse. I. Protoplasma 14, S. 566—621.
- 1933a, Dass., II, Protoplasma 17, S. 509—547.
- 1933b, Dass., III, Protoplasma 18, S. 260—280.
- Guilliermond, A., Mangenot, G., et Plantefol, L., 1933, Traité de Cytologie végétale. E. François, Paris.
- Heitz, E., 1937, Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. Planta 26, S. 134—163.
- Höfler, K., 1936, Vertragen Rotalgen das Zentrifugieren? Protoplasma 26, S. 377 bis 385.
- 1942, Einige Beobachtungen an *Closterium Dianae* und *Pleurotaenium nodulosum*. Protoplasma 37, S. 283—286.
- Knoll, F., 1908, Über netzartige Plasmadifferenzierungen und Chloroplastenbewegung. Sitz.-Ber. d. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl. 117, I, S. 1227—1241.
- Küster, E., 1906, Über den Einfluß wasserentziehender Lösungen auf die Lage der Chromatophoren. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 24, S. 255—259.
- 1911, Über amöboide Formveränderungen der Chromatophoren höherer Pflanzen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 29, S. 362—369.
- 1927, Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Chloroplasten. Protoplasma 2, S. 64—79.
- 1935, Die Pflanzenzelle. G. Fischer, Jena.
- 1937, Pathologie der Pflanzenzelle. II. Pathologie der Plastiden. Protoplasma-Monographien 13, Berlin.
- 1942, Ergebnisse und Aufgaben der Zellmorphologie. Wiss. Forsch. Ber. naturwiss. Reihe 56.
- Lepeschkin, 1938, Kolloidchemie des Protoplasmas. Wiss. Forsch. Ber. naturwiss. Reihe 47.
- Linsbauer, K., und Abramowicz, E., 1909, Untersuchungen über die Chloroplastenbewegungen. Sitz.-Ber. k. Akad. d. Wiss. Wien 118, S. 137—182.
- Merekin, C. E., 1850, Beobachtungen an dem Prothallium der Farnkräuter. St. Petersburg.
- Mottier, 1899, The effect of centrifugal force on the cell. Ann. of Bot. 13, S. 333.

250 T. Diannelidis: Plastiden-Rückverlagerung nach Zentrifugierung u. Narkose

- Peteler, K., 1939, Amöboide Formveränderungen der Diatomeenplastiden. *Protoplasma* **32**, S. 9—19.
- Sauvageau, C., 1917, Sur le mouvement propre des chromatophores. *C. R. Ac. Sc. Paris* **165**, S. 158.
- Schimper, W., 1885, Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **16**, S. 1—247.
- Schürhoff, P., 1924, Die Plastiden. *Handb. d. Pflanzenanatomie, Allg. Teil I*, S. 1—225.
- Senn, G., 1908, Die Gestalt und Lageveränderung der Pflanzenchromatophoren. W. Engelmann, Leipzig.

Über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Vanadium

Von

Richard Blebl

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

(Eingelangt am 16. April 1949)

Einleitung

In einigen vorangegangenen Arbeiten (Biebl 1947 a, b, 1949) wurde darauf hingewiesen, daß bei Resistenzuntersuchungen unterschieden werden muß zwischen „ökologischen Resistenzen“ und „nicht-umweltbedingten konstitutionellen Resistenzen“. Die ersten beziehen sich auf Einwirkungen chemischer oder physikalischer Art, denen die Pflanzen auch am natürlichen Standort ausgesetzt sind und die in ihren Extremwerten bestimmend sind für die Existenzmöglichkeit der Pflanzen an diesem Standort. Die zweiten betreffen das Verhalten der Pflanzenzellen gegenüber Stoffen oder Einflüssen, denen die Pflanzen am natürlichen Standort im allgemeinen nie in größerem Ausmaß begegnen, so daß eine besonders hohe Widerstandskraft oder Empfindlichkeit gegen diese Einwirkungen zur Charakteristik nicht-umweltbedingter Plasmaeigenschaften und damit zur Unterscheidung verschiedener pflanzlicher Plasmasorten herangezogen werden können.

Die sogenannten Spurenelemente haben sich als derartige „Teststoffe“ besonders geeignet erwiesen. Zink, Mangan und Chrom als Sulfate und Bor als Borsäure in Konzentrationsreihen von 0,0001% bis 3% geboten, ließen für verschiedene pflanzliche Plasmen verschieden hoch liegende Resistenzgrenzen auffinden. Dabei war für das Plasma einer bestimmten Pflanze nicht eine allgemein hohe Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen, sondern eine ganz bestimmte „Resistenzkombination“ kennzeichnend. Die Mannigfaltigkeit dieser Kombinationen wird steigen mit der Auffindung weiterer Elemente, denen gegenüber sich verschiedene Pflanzenzellen verschieden resistent verhalten.

Als ein solches geeignetes Element wurde das Vanadium erkannt, und zwar verwendet in der Form des blau kristallisierenden, wasserlöslichen Vanadylsulfats (VOSO_4).

Vanadium wurde in geringen Mengen in vielen Pflanzenaschen, z. B. in denen von Hülsenfrüchtlern gefunden (Gericke 1939). Ferner wurde Vanadium in der Asche der Runkel- und Zuckerrübe, des Weinstocks, von *Fagus*, *Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Populus* und *Carpinus* (Czapek 1920, zitiert in Linstow 1924) und in verschiedenen Sand- und Meerespflanzen (Vinogradov 1934) festgestellt. Auch Kohle enthält Vanadium.

Vanadium ist also für die Pflanzen kein physiologisch fremdes Element. Besonders von angewandt-botanischer Seite (Zusammenfassung bei Scharrer 1944) durchgeführte Düngeversuche zeigten, daß geringe Zugaben von Kalzium- oder Ammoniumvanadat in manchen Fällen zu merkbaren, wenn auch geringen Ertragssteigerungen führen. Gericke und Rennkampff (1940) fanden im Durchschnitt ihrer Versuche eine Ertragssteigerung um rund 3%. Beim Rotklee kommt

es vor allem zu einer besseren Ausbildung des Wurzelsystems. Zwiebel nach Rotklee gebaut, zeigte eine bessere Entwicklung. Dieser Erfolg wird auf eine durch die Wurzeln, bzw. Knöllchenbakterien des Rotklee bedingte stärkere Stickstoffsammlung im Boden zurückgeführt. Bodenuntersuchungen nach Abschluß des Versuchs ließen auch tatsächlich einen höheren Stickstoffgehalt in dem mit Vanadium gedüngten Teilstück nachweisen. Auch Bortels (1938) wies schon auf eine geförderte Entwicklung von stickstoffbindenden Bakterien in Abhängigkeit von Spurenelementen hin. Bei gleicher Konzentration, in der Kalziumvanadinat einen fördernden Einfluß hatte, wirkte Vanadinchlorid schädlich. Vanadium als Kation geboten scheint somit schädlicher zu sein (Gericke und Rennenkampff 1939/40).

Es wird weiter zu verfolgen sein, ob Resistenzuntersuchungen von der Art wie sie im folgenden vom vergleichend protoplasmatischen Standpunkt aus durchgeführt wurden, auch für praktische Fragen der Landbauwissenschaft Bedeutung gewinnen können.

I. Resistenzuntersuchungen

Zur Feststellung der Resistenzgrenzen wurden Epidermisschnitte, in den meisten Fällen von den Blattstielen, in einigen auch von der Blattober- oder -unterseite, in Lösungen von Vanadylsulfat in den Konzentrationsstufen von 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 und 3,0% und in einigen Versuchen auch noch in 5, 10 und 20% VOSO_4 eingelegt und 48 Stunden später auf ihren Lebenszustand geprüft. Die Lösungen wurden mit über Quarzglas doppeltdestilliertem Wasser angesetzt. Die Kontrollen in bidestilliertem Wasser waren nach Schluß des Versuches stets noch vollkommen frisch und lebend.

Die Lösungen erfahren nach kurzer Zeit Farbwandlungen. Unmittelbar nach der Herstellung ist die 3%ige Lösung ultramarinblau, die 1%ige schwach blau und alle übrigen farblos. Nach 24 Stunden hatten, bei einer Temperatur von etwa 20° C, die Lösungen (10 cm³-Lösung in 30 cm³-Fläschchen) zum Teil deutliche Farbbänderungen erfahren: Die 3%-Lösung war unverändert ultramarinblau, die 1%-Lösung war smaragdgrün, die 0,1%-Lösung gelbgrün und die 0,01%ige hatte noch einen leicht gelblichen Stich. Erst die 0,001- und 0,0001%-Lösungen blieben farblos. In den folgenden Tagen traten außer einer Vertiefung der Farben keine wesentlichen Veränderungen mehr auf. Daß es sich dabei um eine Wirkung des Sauerstoffes handelt, wird aus folgendem Nebenversuch ersichtlich: Es wurden je zwei Lösungsreihen einmal fest verkorkt und einmal offen licht- und dunkelgestellt. Die Verfärbungen traten im Licht und im Dunkel gleichermaßen ein, jedoch jedesmal in den offenen Fläschchen intensiver als in den verkorkten. Pirsichle (1934) beobachtete in seinen Kulturlösungen eine blaugrüne Färbung bei Vanadylchlorid und eine dunkelsmaragdgrüne bei den Vanadaten.

Die Versuche wurden zum größten Teil im Juli 1948 bei Lösungstemperaturen von 23 bis 25° C, zum kleineren im Oktober des gleichen Jahres durchgeführt.

a) Blütenpflanzen

35 Blütenpflanzen verschiedenster Familien wurden auf ihr Resistenzverhalten geprüft (Tab. 1). Dabei ergab sich eine Resistenzspanne von 1% bis 0,0001% VOSO_4 .

Tab. 1. Vanadiumresistenz verschiedener Blütenpflanzen.
(Untersucht im Juli und teilweise im Oktober 1948.)

Einwirkungsdauer der Lösungen 48 Stunden.

Versuchspflanze	Untersuchtes Gewebe	VOSO ₄					
		3	1	0,1	0,01	0,001	0,0001
		o/o					
Polygonaceae:							
<i>Polygonum lapathifolium</i> . . .	Stengelepidermis	+	+	+	+	1	1
<i>Rheum Rhabarbarum</i>	"	+	+	+	1	1	1
Chenopodiaceae:							
<i>Atriplex patulum</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
<i>Beta vulgaris</i> , Zuckerrübe . .	"	+	+	+	1	1	1
" " Burgunder	"	+	+	+	1	1	1
" " Rote Rübe	"	+	+	+	+	1	1
Euphorbiaceae:							
<i>Mercurialis annua</i>	Stengelepidermis	+	+	+	+	1	1
Cruciferae:							
<i>Brassica oleracea</i> , Kohlrabi . .	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
" " Karfiol	"	+	+	+	+	1	1
" " Rotkraut	"	+	+	+	1	1	1
<i>Raphanus sativus</i> , Radieschen	"	+	+	+	+	1	1
" " „Scarth of early“	"						
" " „Wiener Mischung“	"	+	+	+	+	1	1
" " Bierrettich	"	+	+	+	+	1	1
Begoniaceae:							
<i>Begonia Scharffiana</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	+	1
Umbelliferae:							
<i>Daucus Carota</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
Primulaceae:							
<i>Cyclamen persicum</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
Solanaceae:							
<i>Solanum tuberosum</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	+	1
" "	Dkl. Keim, Epidermis	+	+	+	+	+	1
<i>Atropa Belladonna</i>	Blattunterseite, Epid.	+	+	+	1	1	1
" "	Blattrippe, Epidermis	+	+	+	1	1	1
" "	Blattoberseite, Epidermis	+	+	+	+	+	1
<i>Solanum nigrum</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
<i>Datura stramonium</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
<i>Solanum lycopersicum</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	1	1
Compositae:							
<i>Senecio vulgaris</i>	Blattstielepidermis	+	+	+	+	+	1
<i>Cirsium arvense</i>	"	+	+	+	+	+	1
<i>Helianthus annuus</i>	Keimlingsstengelepid.	+	+	+	+	1	1
<i>Artemisia campestris</i>	Stengelepidermis	+	+	+	+	1	1
Liliaceae:							
<i>Allium cepa</i> , gelbe Sorte . . .	Schuppe, Außenepidermis	+	+	+	+	1	1
" " " "	" Innenepidermis	+	+	+	+	1	1

1 = lebend, ± = weniger als 50% tot, + = mehr als 50% tot.

Versuchspflanze	Untersuchtes Gewebe	VOSO ₄					
		3	1	0,1	0,01	0,001	0,0001
		%					
<i>Allium cepa</i> , rote Sorte . . .	Schuppe, Außenepidermis	+	+	+	+	1	1
" " " " . . .	" Innenepidermis	+	+	+	+	1	1
Iridaceae:							
<i>Iris florentina</i>	Blatt, Epidermis	+	+	+	±	1	1
" <i>pumila</i>	" "	+	+	+	+	1	1
" <i>trojana</i>	" "	+	+	+	1	1	1
" <i>pallida</i>	" "	+	+	+	1	1	1
Comellineae:							
<i>Rhoeo discolor</i>	Blattunterseite, Epid.	+	1	1	1	1	1
<i>Tradescantia purpusi</i>	" "	+	+	+	+	1	1
<i>Tradescantia zebrina</i>	" "	+	+	+	+	+	1
Orchidaceae:							
<i>Cephalanthera rubra</i>	Blattscheidenepidermis	+	+	+	+	1	1

Die größte Resistenz wies *Rhoeo discolor* auf, deren Epidermiszellen der Blattunterseite noch in 1% durchaus lebten und erst in 3% VOSO₄ fast zur Gänze abgestorben waren. *Dichorisandra ovata* verhielt sich ähnlich. Diese hohe Resistenz ist deshalb bemerkenswert, da andere Vertreter der Comellinaceen, wie *Tradescantia purpusi*, mit einer Lebensgrenze bei 0,001%, und *Tradescantia zebrina* bei 0,0001%, eine sehr hohe Empfindlichkeit gegen Vanadium aufweisen. Die Werte wurden im Juli 1948 bei einer Temperatur der Lösungen von 24,2° C gefunden. Frl. Hagen hat die Versuche im Jänner 1949 im Wiener Pflanzenphysiologischen Institut bei einer Temperatur der Lösungen von +14° C wiederholt und eine gleiche Resistenzdifferenz feststellen können, nur waren ihre Werte fast um eine Konzentrationsstufe nach oben verschoben. *Rhoeo* lebte noch zum größten Teil in 3%, *Tradescantia purpusi* in 0,01 und *Tradescantia zebrina* in 0,001% VOSO₄. Es ist in diesem Fall zu vermuten, daß die hohe Temperatur der Lösungen im Sommer die Ursache ihrer stärkeren Wirksamkeit war und daß es nicht notwendig ist, jahreszeitliche Resistenzverschiebungen als Erklärung heranzuziehen.

Die Schließzellen von *Rhoeo discolor* zeigten gegenüber den übrigen Epidermiszellen eine wesentlich höhere Empfindlichkeit. In meinen Versuchen, in denen die Epidermiszellen erst in 3% VOSO₄ abstarben, waren die Schließzellen noch in 0,01% tot und erst in 0,001% VOSO₄ und darunter lebend.

Die Außen- und Innenepidermen der Zwiebelsschuppen von *Allium cepa* zeigen sowohl bei roten wie bei gelben Sorten eine gleiche Resistenz (Lebensgrenze 0,001% VOSO₄).

Auffallend ist die um eine Konzentrationsstufe niedrigere Resistenz der Blattstielepidermiszellen der Roten Rübe (*Beta vulgaris* subsp. *Rapa* f. *rubra*) gegenüber der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *Rapa* f. *altissima*) und der Burgunderrübe (*Beta vulgaris* subsp. *Rapa*). Zuckerrübe und Bur-

gunderrübe haben die Lebensgrenze für die Blattstielepidermen in 0,01%, die Rote Rübe hingegen bei 0,001% VOSO_4 .

Die große Vanadiumempfindlichkeit von *Solanum tuberosum* (Lebensgrenze erst in 0,0001%) wurde übereinstimmend für die Blattstielepidermen von sechs verschiedenen Sorten (Böhms Allerfrüheste Gelbe, Böhms Mittelfrühe, Kardinal, Sieglinde, Ackersegen, Industrie) und für die Epidermen der Dunkeltriebe von drei verschiedenen nicht näher bekannten Lagerkartoffeln festgestellt. Sie ist als ein charakteristisches Merkmal des Plasmas der Kartoffelpflanzenepidermis anzusehen.

Besondere Erwähnung verdient die Verschiedenheit der Resistenz der Epidermen der Blattoberseite und der Blattunterseite von *Atropa Belladonna*, die in mehreren Versuchen mit verschiedenen Versuchspflanzen stets eine größere Resistenz der Epidermiszellen der Blattunterseite (Lebensgrenze bei 0,01% VOSO_4) gegenüber jenen der Blattoberseite (Lebensgrenze bei 0,0001% VOSO_4) zeigte.

Was die übrigen Resistenzgrenzen anlangt, sei auf Tab. 1 verwiesen.

b) Moose

Die auf ihre Vanadiumresistenz geprüften Laub- und Lebermoose erwiesen sich durchwegs als wesentlich resistenter als die Blütenpflanzen (Tab. 2). Drei *Mnium*-Arten (*M. rostratum*, *M. punctatum*, *M. undulatum*) sowie drei Lebermoose (*Plagiochila asplenioides*, *Bazzania trilobata* und *Trichocolea tomentella*) lebten noch in 3% VOSO_4 zur Gänze und waren erst

Tab. 2. Vanadiumresistenz einiger Laub- und Lebermoose.
(Untersucht im Juli und teilweise im Oktober 1948.)

Einwirkungsdauer der Lösungen 48 Stunden.

Versuchspflanzen	VOSO ₄								
	20	10	5	3	1	0,1	0,01	0,001	0,0001
	%								
Laubmoose (Blättchen):									
<i>Mnium rostratum</i>	+	+	±	1	1	1	1	1	1
<i>Mnium undulatum</i>	+	±	1	1	1	1	1	1	1
<i>Mnium punctatum</i>	+	+	+	1	1	1	1	1	1
Lebermoose (Sprosse, bzw. einzelne Blättchen):									
<i>Plagiochila asplenioides</i>	+	+	±	1	1	1	1	1	1
<i>Bazzania trilobata</i>	±	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Trichocolea tomentella</i>	+	±	1	1	1	1	1	1	1
<i>Metzgeria conjugata</i>	+	+	+	+					
<i>Lophozia Mülleri</i>	+	+	+	+					
<i>Chiloscyphus pallescens</i>	+	+	+	+					

1 = lebend, ± = weniger als 50% tot, + = mehr als 50% tot.

zum Teil in 5 oder 10% abgestorben. *Bazzania trilobata* lebte sogar noch bei dieser Konzentration und war erst in einer 20%igen Lösung tot. Drei andere zarte Lebermoose (*Metzgeria*, *Lophozia*, *Chiloscyphus*) waren allerdings auch schon in 3% größtenteils tödlich geschädigt. Niedrigere Konzentrationen wurden für diese Moose nicht geprüft.

In den 20%igen Lösungen traten zum Teil vor dem Absterben Plasmolysen auf. Die Plasmolysierbarkeit kann gleichzeitig als Nachweis für das Eindringen der Vanadylsulfatlösung durch die Membran dienen und damit als Beweis, daß die Vanadiumlösung auch tatsächlich an den lebenden Protoplasten herankommt. *Metzgeria* zeigte von den Sproßspitzen her weiter-schreitende konvexe Plasmaabhebungen, während bei den *Mnium*-arten die Plasmolyse von der Blattbasis aufsteigend begann. Bei *Trichocolea* und *Plagiochila* war auch nach einer Stunde in 20% VOSO_4 keine Plasmolyse aufgetreten. Brachte man jedoch die gleichen Sprosse darauf in eine annähernd isotonische 1-molare KNO_3 -Lösung, so kam es sofort zu vollkommen normalen Plasmaabhebungen. Der Grund für den Ausfall der Plasmolysen im Vanadylsulfat wurde nicht näher verfolgt. Es sei darauf hingewiesen, daß auch die gegen Vanadium so überaus empfindlichen Epidermiszellen von *Solanum tuberosum* und von der Roten Rübe gleichfalls in 20% VOSO_4 nicht plasmolysierten, wohl aber bei Übertragung in 1 mol KNO_3 Plasmaabhebungen zeigten.

II. Nekrosebilder der Blütenpflanzen

Im Absterben erfährt der Protoplast strukturelle und chemische Veränderungen, die häufig für verschiedene Todesarten ganz charakteristische Absterbebilder ergeben (Lepeschkin 1937, Schindler 1938 a, b, Höfler 1939).

Eine fast allgemeine Todeserscheinung der in Vanadylsulfatlösungen absterbenden Blütenpflanzenepidermen ist die gelbe bis gelbbraune Verfärbung der Zellkerne. Die Kerne sind dabei meist verhältnismäßig zart konturiert und fein gekörnt.

Auf manche Zellen wirken die tödlichen Vanadylsulfatkonzentrationen ausgesprochen fixierend, d. h. der Protoplast wird in seinem Aussehen wenig verändert, das Plasma ist fein koaguliert und nicht von der Wand abgehoben. So z. B. bei den Zellen der inneren zarten Epidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* und annähernd auch bei den Blattstielepidermen der Zuckerrübe oder jenen von *Mercurialis annua*. Die Epidermen von *Senecio vulgaris*, *Atriplex*, den übrigen untersuchten *Betasorten*, sowie die von Karfiol und den Rettichsorten zeigen außer einem koagulierten Plasma und leicht gebräunten Zellkernen keine charakteristischen Absterbebilder.

Auffallend ist das sehr verschiedene Verhalten von Zellen, deren Zellsäfte durch Anthokyan gefärbt sind. Grund hierfür ist wohl die verschiedene Zusammensetzung der einzelnen Anthokyane, bzw. das gleichzeitige Vorhandensein von Zellsaftstoffen, die mit dem Vanadium bestimmte Verbindungen eingehen.

Im einfachsten Fall, wie bei *Rhoeo discolor*, *Dichorisandra ovata*, *Tradescantia purpurea* oder bei der roten Rübe (*Beta vulgaris* subsp. *Rapa*, f. *rubra*) tritt der Zellsaftfarbstoff aus den absterbenden Zellen aus. Die toten Zellen sind entfärbt.

Bei *Cyclamen Persicum* finden wir in der subepidermalen Schicht lange, oft in Streifen liegende, im Leben blauviolett gefärbte anthokyanführende Zellen. Diese

werden im Tod tief tintenblau. Der Zellsaft tritt nicht aus. Irgendwelche Fällungen treten dabei nicht auf.

In den meisten Fällen kommt es jedoch in den anthokyangefärbten Zellen nach dem Absterben zu tropfigen Entmischungen, bzw. zur Bildung von dunkelbraunen Tröpfchen-, Klümpchen- oder Krümelniederschlägen. So etwa bei den anthokyanführenden Epidermis-, bzw. Subepidermiszellen von Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*), *Solanum nigrum*, *Artemisia* und *Rheum Rhabarbarum*. In der subepidermalen Zellschicht des Blattstengels des letztgenannten finden sich Streifen langgestreckter, im Leben weinrot gefärbter Zellen. Im Tod werden diese tintenblau und enthalten einen schwarzblauen tropfigen Niederschlag.

Ähnliche Niederschläge treten auch in Zellen auf, die kein Anthokyan enthalten. So findet sich z.B. in den in Vanadiumlösungen abgestorbenen Blatt-epidermiszellen von *Iris trojana* oft ein dunkel olivbrauner, grob tropfiger Niederschlag, während sich in anderen Zellen des gleichen Schnittes ein besonders dichter feintropfiger Niederschlag bildet. Dieser dichte dunkle Niederschlag ist nur in einzelnen mosaikartig verteilten Zellen zu sehen, deren Verteilung etwa der Lage der in vanadiumtoten Schnitten von *Iris pallida* auftretenden dunkelgelb verfärbten Zellen entspricht. Es handelt sich dabei zweifellos um Zellen, die mit Vanadium besonders reagierende Zellsaftstoffe enthalten.

Auf eine verschiedenartige Verteilung von besonders reaktionsfähigen Zellsaftstoffen in den Geweben einer und derselben Pflanze weisen die verschiedenen Todesbilder in den Epidermen der Blattunter- und der Blattoberseite von *Atropa Belladonna* hin. Diese beiden Epidermen unterscheiden sich nicht nur durch eine verschiedene Resistenz (die Unterseite hat ihre Todesgrenze bei 0,1% VOSO_4 , die Oberseite bei 0,001%) sondern auch in ihrem Absterbebild wesentlich. Während die Epidermen der Blattunterseite und auch der Blattrippe nur koaguliertes, ungefärbtes Plasma mit braunen Zellkernen aufweisen, sind die Epidermiszellen der Blattoberseite schmutziggelblichgrün, mit grobkoagulierte Plasma und teilweise körnigem Niederschlag.

Eine fast schwarzbraune Verfärbung, einschließlich der Zellwand, erfahren die toten Epidermiszellen von *Polygonum lapathifolium*. In vielen Zellen bildet sich hier auch ein tropfiger bis feinklumpiger dunkler olivfarbener Niederschlag.

Schöner Krümelniederschlag ohne Verfärbung des Plasmas oder der Zellwand tritt in den Blattstielepidermiszellen von *Daucus Carota* auf. In den niedrigen, aber bereits tödlich schädigenden Konzentrationen (0,01–0,001%) sind die Krümel oder manchmal auch zähen Tröpfchen mehr über die ganze Zelle verteilt als in 3 und 1% VOSO_4 , wo der Niederschlag meist zu einem zentral gelegenen dichten dunklen Klumpen zusammengedrängt ist.

Die auffallendsten Todesbilder finden sich aber in den Außenepidermiszellen der Zwiebelchuppe von *Allium cepa*, und zwar in gleicher Weise bei gelben wie bei roten Sorten. Dort ist der Todeseintritt mit einer Blaugrünverfärbung des ganzen Schnittes verbunden, so daß schon makroskopisch die Todesgrenze festgestellt werden kann. Während die Schnitte in 0,001% VOSO_4 noch normal gelb, bzw. rot sind, sind sie schon in 0,01% VOSO_4 blaugrün. In dieser tödlich wirkenden Grenzkonzentration zeigten sich öfters in den Epidermen der gelben Zwiebelsorte deutliche Zonungen.

Zonenbildungen an Zwiebelepidermisschnitten wurden schon verschiedentlich beobachtet. Höfler (1943) fand nach Plasmolyse mit 0,6 mol KCl eine Randzone mit wechselnden pathologischen Plasmolyseformen, daran anschließend eine Zone mit Kappenplasmolysen und im Mittelfeld normale Konvexpasmolysen.

Schindler (1938 a, b) beobachtete bei Behandlung mit Säuren und Laugen ein fortschreitendes Absterben der Zellen von außen nach innen, während umgekehrt Kamiya (1939) nach mehrwöchentlicher Wässerung an Zwiebelschnitten die Zellen des Mittelfeldes tot, die Randzellen aber überlebend sah. Damit übereinstimmend beschreibt Schindler (1943) in Kupfersalzlösungen eine größere Resistenz einer schmalen Zone unweit vom Schnitttrand.

In einem meiner in 0,01% VOSO_4 absterbenden Schnitten war in seiner Mitte eine Insel von etwa zwanzig lebenden Zellen mit gelbem Zellinhalt, die in 0,7 GM KNO_3 normal bikonvex plasmolysierten. Daran anschließend, die lebende Insel fast vollkommen umgreifend, einige Reihen toter ockergelb gefärbter Zellen, um diese wieder 1—3 Zellreihen von gelbgrünen Zellen, in denen bereits ein feinkrümeliger, fast flockiger Niederschlag auftrat und schließlich um diese die Hauptmasse jener dunkelspangrünen toten Zellen, die in vollständig abgetöteten Schnitten, bzw. in allen höheren Konzentrationen allein zu finden sind. Diese Zellen, deren spangrüne Farbe oft fast ins tintenblaue übergeht, enthalten einen feinen krümeligen Niederschlag.

Der Zellsaft der Außenepidermen der Zwiebelschuppe gibt auch mit verschiedenen anderen Substanzen ganz charakteristische Niederschläge. So treten z. B. in 3% Borsäure (H_3BO_3) gelbe krümelige Niederschläge auf. In Kobaltnitrat fand Schindler (1943) zitronengelbe, in Kobaltazetat grüne Fällungen und in Kupferchlorid dunkelbraun gefärbte körnige Niederschläge. Es wird zu untersuchen sein, ob es sich dabei vielleicht um verschiedene Reaktionen ein und derselben Zellsaftstoffe handelt.

Zusammenfassung

Die Untersuchung zeigt, daß die Resistenz gegen Vanadylsulfat bei verschiedenen Pflanzen charakteristische Unterschiede aufweist. Die Resistenzgrenzen schwanken bei Blütenpflanzen in einem Bereich von 1 bis 0,0001% VOSO_4 , während Laub- und Lebermoose zumeist in 3% dieser Lösung noch leben und manchmal sogar noch durch 5- und 10%ige Lösungen innerhalb von 48 Stunden keine merkbaren Schädigungen erfahren.

Die Nekrosebilder der Epidermiszellen der Blütenpflanzen sind recht mannigfaltig und zum Teil wohl durch die Reaktion verschiedener Zellsaftstoffe mit dem Vanadylsulfat bedingt. Anthokyanangefärbte Zellen verhalten sich nicht einheitlich. Man findet Entfärbungen der toten Zellen, Umfärbungen oder auch Entmischungen und Bildung verschiedenartiger Niederschläge.

Das Vanadium erweist sich nach den bisherigen Erfahrungen als ein geeigneter Stoff, um im Verein mit anderen „Teststoffen“, wie Verbindungen von Bor, Zink, Mangan und Chrom, in charakteristischen „Resistenzkombinationen“ im Dienste der vergleichenden Protoplasmatik verschiedene pflanzliche Plasmasorten beschreibend zu erfassen.

Literatur

- Biebl, R., 1947 a, Die Resistenz gegen Zink, Bor und Mangan als Mittel zur Kennzeichnung verschiedener pflanzlicher Plasmasorten. Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math.-nat. Kl., Abt. I, 155, 145.
- 1947 b, Über die gegensätzliche Wirkung der Spurenelemente Zink und Bor auf die Blattzellen von *Mnium rostratum*. Österr. Bot. Ztschr. 94, 61.
- 1949, Vergleichende chemische Resistenzstudien an pflanzlichen Plasmen. Protoplasma 39, 1.

- Bortels, H., 1938, Entwicklung und N-Bindung bestimmter Mikroorganismen in Abhängigkeit von Spurenelementen und vom Wetter. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 56.
- Czapek, Fr., 1920, Biochemie der Pflanze. 2. Aufl., II. Bd., Jena.
- Gericke, S., 1939, Neue Ergebnisse über die Wirkung von Spurenelementen: Vanadium. (Referat), Umschau 43, 929.
- und Rennenkampff, E. v., 1940, Untersuchungen über die Wirkung des Vanadiums auf das Pflanzenwachstum. Bodenkunde und Pflanzenernährung 18, 305.
- 1939/40, Die Wirkung des Spurenelementes Vanadium auf das Pflanzenwachstum. Prakt. Blätter Pflanzenbau und Pflanzenschutz 17, 17 (München).
- Höfler, K., 1934, Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. Ztschr. wiss. Mikr. 51, 70.
- 1938, Nekroseformen pflanzlicher Zellen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 56, 451.
- Kamiya, N., 1939, Zytomorphologische Plasmolysestudien an *Alliumepidermen*. Protoplasma 32, 373.
- Küster, E., 1939, Pathologie der Pflanzenzelle. Teil I, Pathologie des Protoplasmas. Protoplasma-Monographie 3, Berlin.
- Lepeschkin, W. W., 1937, Zellnekrobiose und Protoplasmatod. Protoplasma-Monographie 12, Berlin.
- Linstow, O. v., 1924, Die natürliche Anreicherung von Metallsalzen und anderen anorganischen Verbindungen in den Pflanzen. Repert. spec. nov. regni vegetabilis, Beihefte 31, Dahlem.
- Pirschle, K., 1934, Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger*. Planta 23, 177.
- Scharrer, K., 1944, Biochemie der Spurenelemente. Berlin: Parey.
- Schindler, H., 1938 a, Tötungsart und Absterbebild. I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30, 186.
- 1938 b, II. Der Säuretod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30, 547.
- 1943, Protoplasmatod durch Schwermetallsalze.

Sammelreferat
**Grundzüge der
intraindividuellen Plasmon-Umkombination¹**

Von

Peter Michaelis

(Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Voldagsen über Elze)

Mit 8 Textabbildungen

(Eingelangt am 2. Juli 1949)

A. Einleitung

An verschiedenen *Epilobium*-Kreuzungen, besonders an *Epilobium-hirsutum* × *parviflorum*-Bastarden wurden zahlreiche Abänderungen rezi-



Abb. 1. Überwinterte Pflanzen des *Epilobium-hirsutum* - Jena - ♀ × *parviflorum* - Rentweinsdorf-♂-Bastardes. Links typische kleinblättrige Pflanze des entwicklungsgehemmten Bastardes, an der im oberen Teil einige normalisierte Plasmonvarianten entstehen. An den Pflanzen rechts haben die Plasmonvarianten den Ausgangsbastard fast völlig überwachsen.

proker Unterschiede beobachtet (Brücher 1940, Michaelis-Roß 1943, Michaelis 1948 a, 1949 a). Die meisten dieser Bastarde zeigen größte reziproke Unterschiede: Während die Kreuzung mit *Epilobium-parviflorum*-Plasma normal entwickelt ist, ist die Gegenkreuzung, besonders mit den Plasmen der *Epilobium-hirsutum*-Sippen, Essen und Jena, stark entwicklungsge-
stört. Sie wird nur wenige Zentimeter hoch und kommt normalerweise

nicht zur Blüte (vgl. Abb. 4 links). An diesen

Zwergpflanzen treten nach Überwinterung zahlreiche Abänderungstrieb-
auf, bei denen die ursprünglichen Entwicklungsstörungen in mehr oder minder hohem

Grade beseitigt sind und die infolgedessen den ursprünglichen Wuchstyp schnell verdrängen (Abb. 1). Im Laufe der Jahre wurden mehr als 1300 solcher

¹ Vortrag, gehalten an der Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Kassel am 10. Juni 1949.

Abänderungen protokolliert und zum Teil über fünf Jahre kultiviert. In ausführlichen Kreuzungsreihen ließ sich nachweisen, daß die untersuchten Varianten auf Abänderungen des plasmatischen Erbgutes beruhen (Michaelis 1947, 1949a). Diese Abänderungen zeigen eine Anzahl wichtiger, kennzeichnender Eigentümlichkeiten, über die schon kurz berichtet wurde, die aber noch einer gemeinsamen theoretischen Deutung bedürfen.

B. Die experimentellen Grundlagen

Von besonderem Interesse ist hier, daß die Abänderungen gerichtet erfolgen, daß sie gelegentlich gleitend vor sich gehen, zu einer Parallele zwischen Modifikationen und erblichen Abänderungen führen und meist mit einer starken und komplizierten Chimärenbildung verbunden sind.

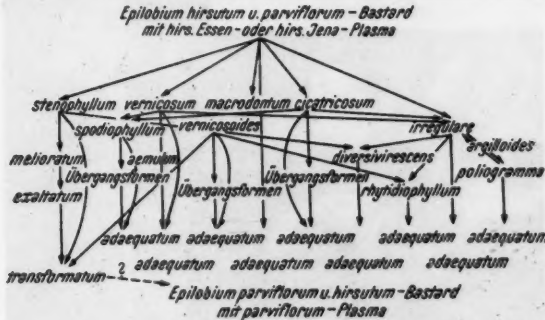


Abb. 2. Schema der bisher beobachteten Abänderungswege.

1. Die gerichtete Abänderung

Unter den Abänderungen der reziprok verschiedenen *Epilobium-hirsutum* \times *parviflorum*-Bastarde läßt sich eine größere Zahl von Plasmotypen unterscheiden, die neben anderem durch ihren sehr verschiedenen Hemmungsgrad gekennzeichnet sind. Einige von ihnen stehen dem gestörten Ausgangsbastard nahe, andere sind wesentlich schwächer gestört, es wurden aber auch stark heterotische Formen beobachtet und Plasmotypen, die sich in ihrem Wuchs nicht mehr von der normalen reziproken Kreuzung unterscheiden lassen. Es läßt sich ganz allgemein feststellen, daß die neu entstehenden Abänderungen, seien es die, die primär aus dem gestörten Ausgangsbastard entstehen, oder die, die in sekundären Abänderungsschritten aus den primären hervorgehen, stets von stärkeren zu schwächeren Hemmungsgraden führen, also einseitig auf eine Beseitigung der Entwicklungsstörungen ausgerichtet sind (Michaelis 1949a, d und Tabelle I bei Michaelis 1948b, S. 33). Im einzelnen lassen sich verschiedene sehr spezifische Abänderungswege festlegen (Abb. 2).

2. Die gleitende Variabilität

Die meisten Abänderungen entstehen plötzlich und sprungweise, wie das auch von der Gen- und Chromosomenmutation her bekannt ist. Die Abänderungen können jedoch auch völlig fließend und gleitend auftreten

(Michaelis 1948b). Durch Zerlegung einer solchen gleitenden Abänderung in Stecklinge oder durch Kreuzung von Blüten verschiedener Insertionshöhe lassen sich unter günstigen Verhältnissen die einzelnen Etappen der Normalisierung fixieren (Abb. 3).



Abb. 3. Gleitende Normalisierung des *hirsutum*-Essen-♀ × *parviflorum*-Tübingen-♂-Bastardes über *stenophyllum*, *vernicosoides* und *rhytidophyllum* zu *adaequatum*. Der abgebildete Trieb wurde in Stecklinge zerlegt. Die überwinterten Stecklingsrosetten der entsprechenden Zonen sind links abgebildet. (rhyt.-Steckling stark vergrößert.)

3. Die Parallelität zwischen Modifikationen und erblichen Plasmonabänderungen

Durch Behandlung mit niederen Temperaturen und Kurztag, also mit einem imitierten Winterklima läßt sich der ursprüngliche Zwergbastard so stark modifikativ normalisieren, daß die Pflanzen zur Blüte gelangen und kaum mehr von der reziproken Kreuzung zu unterscheiden sind. Sie gleichen

dann völlig der erblichen Abänderung *adaequatum*, die sehr häufig im Laufe des natürlichen Winters entsteht (Abb. 4). Modifikation, erbliche Abänderung und reziproke Kreuzung lassen sich nur an Hand ihrer vegetativen und generativen Nachkommen unterscheiden (Michaelis 1948c).

4. Die Chimärenbildung

Es ist sehr auffällig, daß zwischen den vegetativen Abänderungsmöglichkeiten und den generativen Nachkommen der Abänderungen gewisse Ähnlichkeiten bestehen. Als Beispiel kann die Abänderung *vernicosum* genannt werden. In ihrer Nachkommenschaft treten in überwiegender Zahl die für

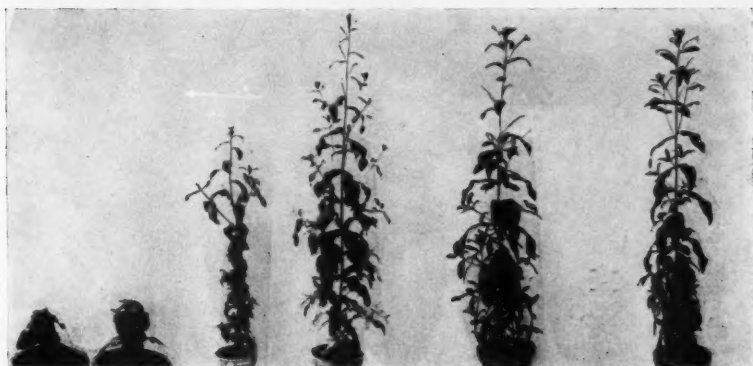


Abb. 4. Parallele zwischen Modifikation und erblicher Plasmonabänderung. Von links nach rechts: Zwei Pflanzen des ursprünglichen *Epilobium-hirsutum*-Essen-♀ × *parviflorum*-Tübingen-♀-Bastardes (doppelte Vergrößerung gegenüber den übrigen Pflanzen!). Rechts daneben zwei gleichalte Pflanzen, die unter Kurztag- und Kältebehandlung modifikativ normalisierten. Die vegetativen und generativen Nachkommen sind wieder entwicklungsgestört. Rechts daneben die im Laufe des natürlichen Winters entstandene Plasmonabänderung *adaequatum*, deren Nachkommen der Mutter gleichen. Ganz rechts die reziproke Kreuzung *Epilobium parviflorum* ♀ × *hirsutum* ♂.

vernicosum kennzeichnenden gestauchten Pflanzen auf, daneben kommen je nach der Kreuzungsart in Häufigkeiten zwischen 21 und 39% Plasmotypen des *irregulare*-Komplexes vor. Parallel hiezu wurden unter 57 vegetativen Abänderungen von *vernicosum* ebenfalls in einer Häufigkeit von 23% dieselben Plasmonabänderungen des *irregulare*-Komplexes gefunden. Unter den vegetativen und generativen Nachkommen der Abänderung *aemulum* dagegen, die am häufigsten vegetativ aus *vernicosum* entsteht, fehlen die Plasmotypen des *irregulare*-Komplexes vollständig. Mit der Entstehung von *aemulum* aus *vernicosum* ist demnach der *irregulare*-Komplex in Wegfall gekommen.

Noch auffälliger liegen die Verhältnisse bei der Abänderung *irregulare*, das seinen Namen deshalb erhalten hat, weil seine Blätter unregelmäßig

verstreut verschieden gefärbte Blattareale und Blattdefekte tragen. Die Blätter sehen so aus, als wären sie aus verschiedenartigen Gewebeanteilen zusammengesetzt (Abb. 5). Unter den Nachkommen von *irregulare* treten nun neben einer überwiegenden Zahl von *irregulare*-Pflanzen verschiedene neue Plasmotypen auf: das gelbgrüne *diversivirescens*, das silbrig gestreifte *poliogramma*, das mit dunkelgrünen Wülsten versehene *rhytidiophyllum* und das völlig normale *adaequatum*. In einem größeren Versuch wurden nun verschiedene Blüten einzelner Stecklinge und verschiedene Stecklinge einer einzigen *irregulare*-Pflanze auf ihren Erbgang geprüft (Michaelis 1949 a, Tabelle VI). Es zeigte sich, daß die Einzelteile der einen Pflanze ganz verschiedene Nachkommenschaften ergeben. Bei den Nachkommen verschiedener Blüten eines Stecklings kann die Häufigkeit an *adaequatum*

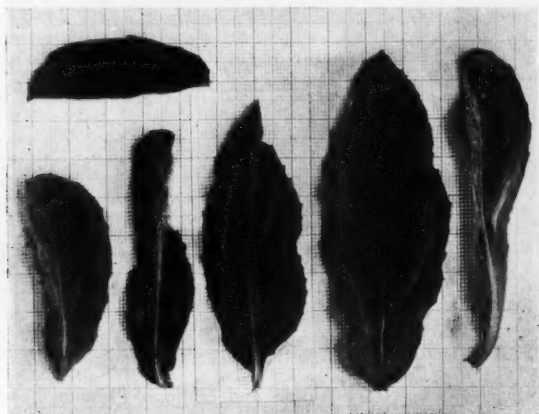


Abb. 5. Typische Blätter der Plasmonabänderung *irregulare*.

zwischen den Extremen 0 und 100%, der durchschnittliche Störungsgrad der *irregulare*-Nachkommen zwischen 0 und 2,2 einer vierteiligen Bewertungsskala schwanken. Weiterhin gibt es Stecklinge, die im Durchschnitt nur 7,5% und solche, die durchschnittlich 70,4% *adaequatum*-Nachkommen, respektive 87,5% oder nur 1,5% *irregulare*-Nachkommen ergaben. An einer einzelnen *irregulare*-Pflanze manifestieren sich also nicht nur mannigfache Gewebeabweichungen, die Abänderung ist auch genetisch aus recht verschiedenen Teilen zusammengesetzt.

An diesen *irregulare*-Pflanzen können nun dieselben Plasmotypen, wie sie unter den generativen Nachkommen vorkommen, auch als vegetative Abänderungen auftreten. Abb. 6 zeigt die Entstehung solcher *diversivirescens*-, *poliogramma*-, *rhytidiophyllum*- und *adaequatum*-Triebe. Vergleicht man nun die Nachkommenschaften der Ausgangsform *irregulare* mit denen der vegetativ entstandenen *rhytidiophyllum*-Triebe derselben Pflanze (Michaelis 1949 a, Tabelle VI), so läßt sich feststellen, daß mit der Entstehung von *rhytidiophyllum* aus *irregulare*, das heißt, mit dem Verlust der *irregulare*-Blattdefekte auch der Gehalt an *irregulare*-Pflanzen in der Nachkommenschaft von Werten um rund 80% auf Werte zwischen

1 bis 8% sinkt, während der Prozentgehalt an *rhytidiophyllum*-Nachkommen ungefähr gleichbleibt. *Rhytidiophyllum* entsteht also durch eine quantitative Verringerung der *irregulare*-Anteile.

Die Untersuchung der Chimären, besonders die Untersuchung einzelner, verschiedenartig zusammengesetzter Blätter erlaubt wichtige Rückschlüsse über die stofflichen Grundlagen der plasmatisch vererbten Merkmale. Man kann auf solchen Blättern nebeneinander verschiedene quantitative Abstufungen, z. B. der einen Abänderung *poliogramma* an der verschiedenen Dichte der *poliogramma*-Streifung, erkennen (Abb. 7 Mitte). Weiterhin wurden Blätter von Periklinalchimären beobachtet, bei denen über einem einheit-

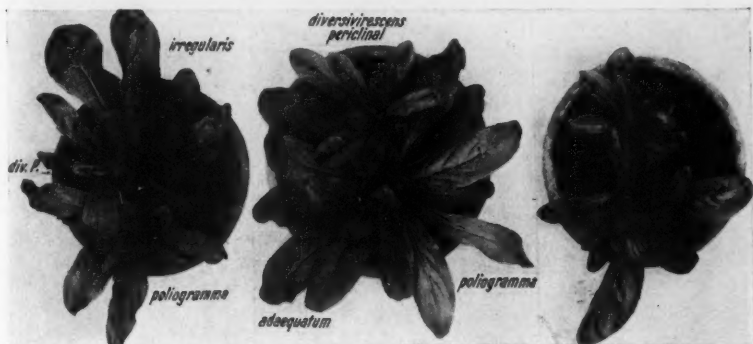


Abb. 6. Überwinterungsrosetten der Abänderung *irregulare* mit sekundären Abänderungen. Pflanze links im oberen Teil typisch *irregulare*, in der Mitte einige Blätter einer *diversivirescens*-Periklinalchimäre. Die untere Sprosshälfte besitzt die silbrige *poliogramma*-Streifung. — Mittlere Pflanze oben eine Trieb einer *diversivirescens*-Periklinalchimäre. Links unten ein völlig normaler *adaequatum*-, rechts unten ein *poliogramma*-Sektor. — Pflanze rechts im oberen Teil noch *irregulare*, in der Mitte die dunkelgrünen verschmälerten und verkrümmten Blätter der Abänderung *rhytidiophyllum*. Blätter rechts unten mit *adaequatum*-Blatthälften.

lichen Korpus eine Tunica liegt, die aus drei verschiedenen Gewebsektoren zusammengesetzt ist (Abb. 7 und Abb. 7 a bei Michaelis 1949 a). Besonders wichtig ist nun, daß die einzelnen Abänderungstypen nicht nur neben- und übereinanderliegen, sondern sich auch gegenseitig durchdringen können. Dabei können sich die Plasmotypen ungleichmäßig über das Blatt ausbreiten, das heißt, die Umgrenzungen der verschiedenen Plasmotypen können, trotzdem die Plasmotypen in derselben Zellschicht vorkommen, sich überschneiden und überlagern. In einzelnen Fällen läßt sich das gemeinsame Vorkommen in derselben Zellschicht auch genetisch an den Nachkommenschaften erweisen.

Ein solches Verhalten ist nur möglich, wenn die einzelnen Plasmotypen auf verschiedenen stofflichen Grundlagen beruhen, die bei den Zellteilungen in den Meristemen unabhängig voneinander verteilt werden. In dem Schema der Fig. 8 sind die bisher beobachteten Durchmischungsmöglichkeiten dar-

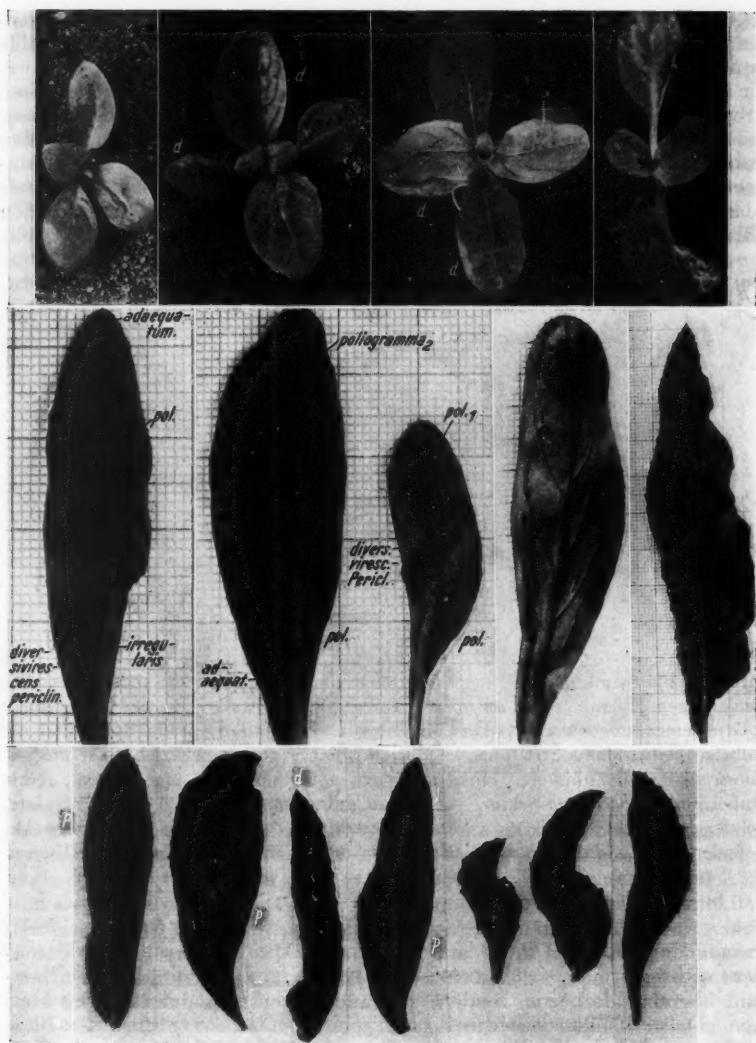


Abb. 7. Komplizierter zusammengesetzte Blätter von Plasmonvarianten. Obere Reihe: Keimpflanzen aus der Nachkommenschaft der *vernicosum*-Abänderung. Linke Pflanze: Oberes Blatt *irregulare* + *pallidovariabile*, unteres Blatt *pallidovariabile*. 2. Pflanze: *Vernicosum* + *diversivirescens*. An dem oberen und unteren Blatt fehlt in einem keilförmigen Sektor (...) an der Mittelrippe *diversivirescens* unter Beibehaltung von *vernicosum*. Die Blätter oben rechts tragen am Rand *pallidovariabile* (p). 3. Pflanze: *Diversivirescens*, das an der Spitze des linken Blattes fehlt (...). Die linke Blatthälfte des unteren Blattes sowie ein Sektor des

gestellt. Es lassen sich vier bis fünf unabhängige genetische Gruppen unterscheiden. Dabei nimmt die Abänderung *pallidovariabile* eine Sonderstellung ein. Diese Abänderung beruht auf einem plasmoninduzierten, labilen Gen (Michaelis 1949 c), wird also im Gegensatz zu allen übrigen Abänderungen chromosomal vererbt. Eine unabhängige Ausbreitung des *pallidovariabile*-Merkmales von den Plasmonabänderungen ist daher zu erwarten. *Diversivirescens* ist vielleicht durch das Plasmom bedingt. Die übrigen Abänderungen müssen wohl anderen plasmatischen Erbkonstituenten zugeordnet werden.

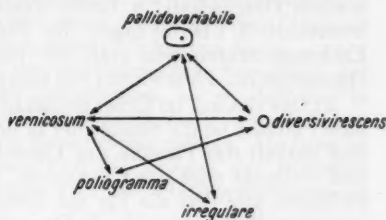


Abb. 8. Schema der Durchmischungsmöglichkeiten.

C. Theorie der intraindividuellen Plasmon-Umkombination

Versucht man die geschilderten experimentellen Befunde zu deuten, so liegt es nahe, zuerst an eine Mutation der plasmatischen Erbkonstituenten zu denken. Berücksichtigt man aber, daß die Abänderungen gerichtet und gleitend entstehen und zu einer Parallele zwischen Modifikation und erblicher Abänderung führen können, so wäre man zu dem Schluß gezwungen, daß die Mutation der plasmatischen Erbträger anderen Gesetzen unterliegt als die Mutation der Kerngene, wo diese Erscheinungen fehlen. Eine solche Annahme erscheint erst dann berechtigt zu sein, wenn andere Erklärungsmöglichkeiten ausscheiden. Eine solche Erklärungsmöglichkeit ist aber meines Erachtens die Annahme einer Umkombination bestimmter distinkter Erbkonstituenten des Plasmas. Sie wird durch das Verhalten der Chimären sehr wahrscheinlich gemacht.

rechten Blattes enthält neben *diversivirescens pallidovariabile*. Pflanze ganz rechts: *Diversivirescens + vernicosum*. Letzteres fehlt in einem Sektor links unten und läßt das reine *diversivirescens* erkennen.

Mittlere Reihe: Blätter erwachsener Pflanzen. Linkes Blatt: Linke Blatthälfte *diversivirescens*-Periclinalachimäre mit hellgrünem Rand (---). Rechte Blatthälfte *adaequatum*, das unten einen *irregulare* Randdefekt besitzt, der nach oben in einen *poliogramma*-Randstreifen übergeht (...). 2. Blatt: Linke Blatthälfte *adaequatum*, rechte Blatthälfte *poliogramma*, unten mit lockeren Streifen, oben mit dichter, völlig zusammenfließender Streifung. 3. Blatt: Linke Blatthälfte *diversivirescens*-Periclinalachimäre (---), rechte Blatthälfte *poliogramma* (...) mit verschieden dichter Streifung. 4. Blatt: Periclinalachimäre, deren Tunica links *diversivirescens* (---), rechts *poliogramma* ist. Areal der Blattspitze zwischen den obersten Seitennerven wie wahrscheinlich der Korpus des Blattes *adaequatum* (...). Blatt ganz rechts in der ganzen Ausdehnung *diversivirescens*. Die rechte Blatthälfte enthält zusätzlich *poliogramma*.

Untere Reihe: 1., 2. und 4. Blatt *irregulare*, je eine Blatthälfte mit zusätzlichem *poliogramma*. 3. Blatt *irregulare*; oberer keilförmiger Sektor *diversivirescens*. 5. und 6. Blatt enthalten *irregulare + vernicosum* gemeinsam. Blatt ganz rechts *vernicosum*. Linke Blatthälfte durch zusätzliches *irregulare* in Wegfall gekommen.

1. Das Plasmon als Erbsumme

Schon vor fünf Jahren wurde in einem Vortrag vor der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Berlin ausgeführt (Michaelis 1949b), daß nach theoretischen Überlegungen das Plasmon eine Summe von verschiedenen Erbkonstituenten sein muß, die einer intraindividuellen Umkombination zugänglich ist. Es seien nur die Hauptpunkte wiederholt:

a) Das von uns im Erbexperiment durch mütterliche Vererbung nachweisbare Plasmon ist die Summe der in der Eizelle enthaltenen Erbkonstituenten und enthält das Plastom der Plastiden, das Zytoplasmon des Zytoplasmas und vielleicht auch das Chondriom. Plasma, Plastiden und Chondriosomen enthalten alle drei die für die Vererbung und identische Reproduktion so wichtigen Nucleoproteide. b) Da weiterhin bei der Befruchtung die Isogamie das ursprüngliche Verhalten ist, so muß auch eine Mischung verschiedener Plasmen primär vorkommen. Selbst bei höheren Pflanzen und Tieren ist nach neueren zytologischen und genetischen Untersuchungen eine Übertragung männlichen Plasmas durch Pollenschlauch und Spermien häufiger, als man früher annahm. Bei *Epilobium*, wo eine Plasmamischung bei der Befruchtung sehr selten ist, läßt sich in Ausnahmefällen eine Mischung verschiedener Plasmone wahrscheinlich machen. c) Da schließlich bei der Zellteilung kein Vorgang bekannt ist, der mit Sicherheit eine erbgleiche Verteilung der plasmatischen Erbträger gewährleisten könnte, muß eine intra-individuelle Umkombination zum mindesten in bestimmten Fällen theoretisch möglich sein. Diese Überlegungen stehen im Einklang mit den geschilderten experimentellen Befunden und werden durch sie belegt.

Es soll nun auf die schon früher erörterten Voraussetzungen der Plasmonumkombination nicht weiter eingegangen werden, sondern die Grundzüge der Plasmonabänderung selbst besprochen werden, wie sie sich auf Grund theoretischer Überlegungen und experimenteller Beobachtungen abzuzeichnen beginnen. Sie sind zur Deutung einer ganzen Anzahl wichtiger Erscheinungen von großem Interesse.

2. Abänderungsmöglichkeiten des plasmatischen Erbgutes

Zellen mit verschiedenem plasmatischem Erbgut können auf sehr verschiedene Weise entstehen:

a) Durch Mutation einzelner plasmatischer Erbträger. Über solche Plasmonmutationen ist abgesehen von den Plastidenmutationen so gut wie nichts bekannt. Welche Möglichkeiten und Gesetzmäßigkeiten bei der Mutation plasmatischer Erbträger vorliegen, muß einstweilen offen bleiben. Es ist nur zu vermuten, daß sie sich nicht prinzipiell von der Mutation der Kerngene unterscheiden wird. In dem hier interessierenden Zusammenhange ist es wichtig, daß eine Mutation in den meisten Experimenten von einer Umkombination überlagert und daher nur schwer von dieser abzutrennen sein wird. In der Zelle dürften in der Regel zahlreiche Erbkonstituenten gleicher Sorte vorkommen, von denen nur einzelne von der Mutation betroffen werden. Es wird in den meisten Fällen einer Entmischung der ursprünglichen und der mutierten Erbkonstituenten bedürfen, um die Erbänderung sichtbar zu machen.

b) Zweitens können Plasmonabänderungen durch Mischung verschiedener Plasmen bei Fusionen von Zellen und Zellteilen entstehen. Vegetative Fu-

sionen dürften im allgemeinen ohne größere Bedeutung sein. Um so wichtiger ist die Plasmamischung bei der Befruchtung, die je nach den Mengenverhältnissen der sich vereinigenden Idioplasmen zu ganz verschiedenen Erbverhältnissen führt und eventuell sogar einen Nachweis eines Plasmons auf dem Wege der mütterlichen Vererbung unmöglich machen kann.

c) Ein dritter wichtiger Faktor ist die ungleichmäßige Verteilung der plasmatischen Erbkonstituenten bei den Zellteilungen, sei es, daß eine in der Zelle schon gegebene ungleiche Verteilung durch Zellteilungen fixiert wird, sei es, daß nur eine zufallsgemäße Entmischung erfolgt. Als Beispiel von vielen möglichen sei für den ersten Fall die Teilung der tierischen Mosaik-eier, als Beispiel für den zweiten Fall die Plastidenentmischung albamaculater Pflanzen genannt.

d) Weiterhin können plasmatische Erbunterschiede durch eine ungleichmäßige Vermehrungsgeschwindigkeit einzelner Erbkonstituenten entstehen. Einzelne Fälle solcher Art sind z. B. bei den Plastiden bekanntgeworden.

e) Schließlich ist es theoretisch möglich, daß Unterschiede im plasmatischen Erbgut durch Inaktivierung bestimmter Zytoplasmabestandteile im Laufe der ontogenetischen Entwicklung entstehen, sei es, daß aktives, lebendes und sich identisch reproduzierendes Eiweiß irreversibel ab- oder umgebaut wird, sei es, daß es zum Bau plasmatischer Zellorganellen Verwendung findet und dabei reversibel inaktiviert wird. Es läßt sich die Hypothese aufstellen, daß ein solches Verhalten relativ häufig ist, daß es mit den Determinationsvorgängen im Zusammenhang steht, und daß die Teilungsunfähigkeit bestimmter ausdifferenzierter Zellen mit solchen Veränderungen des plasmatischen Erbgutes zusammenhängt.

f) Schließlich könnte man noch an eine Neubildung von Plasmakonstituenten denken. Die in der angelsächsischen Literatur vielfach diskutierte Produktion von Plasmagenen durch entsprechende Gene des Zellkernes ist noch unsicher und fraglich. Eine parallele Wirkung von Kerngenen und plasmatischer Vererbung berechtigt noch nicht zur Annahme genbürtiger Plasmagene. Derselbe Effekt kann auch durch eine selektive Wirkung des Genoms auf die Umkombination des Plasmons zustande kommen.

5. Die Beeinflussung der Plasmonumkombination

Es ist nun wichtig, daß die soeben angeführten Abänderungsvorgänge in sehr verschiedener Weise einer Beeinflussung zugänglich sind.

a) Bei der Plasmonmutation wird man in Analogie zur Genmutation annehmen dürfen, daß zum mindesten die Höhe der Mutationsrate beeinflussbar ist.

b) In bezug auf die Plasmamischung bei der Befruchtung ist noch zu untersuchen, ob z. B. die Übernahme männlichen Plasmas und seine Einbeziehung in die Meristeme des Embryos von Umweltseinflüssen abhängig und experimentell abänderbar ist. Auch ist zu prüfen, ob dabei eine völlige Durchmischung oder nur ein Nebeneinander der väterlichen und mütterlichen Plasmen vorkommt.

c) Wichtig ist, daß die Anordnung der einzelnen Zellbestandteile in der Zelle von inneren und äußeren Faktoren abhängig und experimentell beeinflussbar ist. Die Entwicklung der Tiere liefert hiezu mannigfache Beispiele. Auch ist es wahrscheinlich, daß die Mischung der Plasmen bei der Befruchtung und die Entmischung bei den folgenden Zellteilungen z. B. von den wechselnden Hydratations- und Viskositätszuständen, von der Inten-

sität der Plasmaströmung und anderen zellphysiologischen Verhältnissen abhängig sind.

d) Als Beispiel für eine Beeinflussung der relativen Teilungsgeschwindigkeit ist die Teilungsverzögerung der *Euglena*-Plastiden gegenüber der Zellteilungsgeschwindigkeit unter dem Einfluß des Lichtmangels zu nennen. Sie kann bei organischer Ernährung zu einer Plastidenverarmung der Zellen und schließlich durch völligen Plastidenverlust zu chlorophyllfreien, saprophytischen Formen führen (Ternetz 1912).

e) Daß eine eventuell vorkommende Inaktivierung bestimmter Plasmaanteile im Laufe der Ontogenie und während der Determinationsvorgänge unter der Beeinflussung innerer und äußerer Faktoren vor sich gehen wird, braucht nicht weiter betont zu werden.

Unter diesen Umständen werden sowohl die genetischen Faktoren, wie die äußere und innere Umwelt einen direkten oder indirekten Einfluß auf die Plasmonabänderung nehmen können. Dem entspricht, daß die in den Versuchen des Verfassers beobachteten Plasmonvarianten nur unter ganz bestimmten Umweltsbedingungen der Pflanzen, nur in bestimmten Entwicklungsstadien und nur bei bestimmten Genotypen beobachtet wurden.

4. Wann und wo ist eine Beeinflussung der Plasmonumkombination möglich?

Es ist wichtig, daß die die Plasmonumkombination beeinflussenden Faktoren in sehr verschiedenen Phasen des Abänderungsvorganges wirksam werden können.

a) Ihr Einfluß kann sich auf die Auslösung der Umkombination beschränken, wobei der Umkombinationsvorgang dann eigengesetzlich oder zufallsgemäß abläuft. In den Versuchen des Verfassers scheint z. B. das winterliche Klima bevorzugt in diesem Sinne zu wirken, während es bisher noch nicht gelungen ist, das Verhältnis der einzelnen Plasmotypen zueinander wesentlich durch hohe oder niedere Temperaturen zu verändern.

b) Weiterhin ist anzunehmen, daß die Umwelt in bestimmten Fällen den Abänderungsvorgang selbst beeinflussen kann, sei es in quantitativem oder qualitativem Sinne. Der soeben erwähnte Einfluß des Lichtmangels auf die Teilungsrate der *Euglena*-Plastiden gehört hierher. Vielleicht kommt auch die mehrfach beobachtete Umprägung des Plasmons durch einen eingekreuzten fremden Zellkern (Michaelis 1933, 1948 e) auf diese Weise zustande. Es kann weiterhin die Hypothese aufgestellt werden, daß die meisten experimentell erhaltenen Dauermodifikationen auf solchen direkten Veränderungen des plasmatischen Erbgutes beruhen.

c) Schließlich können die verschiedenen Faktoren erst nachträglich auf die Lebensfähigkeit der abgeänderten Plasmotypen Einfluß nehmen. Alle Plasmonabänderungen haben natürlich einen Selektionswert, der je nach den Umweltsbedingungen positiv, neutral oder negativ sein kann. Bei dem Versuchsobjekt des Verfassers läßt sich sowohl eine gegenseitige Konkurrenz, wie auch eine Veränderung des Selektionswertes unter verschiedenen Umweltsbedingungen leicht feststellen.

Bedeutungsvoll ist es nun, den Wirkungsort der einflußnehmenden Faktoren zu betrachten. Sie können auf ganz verschiedenen Ebenen des Individuums wirksam werden.

a) Einmal in der Einzelzelle. Das gilt vor allen Dingen für die primären Abänderungsvorgänge der Mutation, Mischung, selektiven Vermehrung usw.

Da alle Bestandteile der Zelle gemeinschaftlich ein einheitliches System bilden, wird in diesem Falle auch der Abänderungsvorgang in mannigfacher Weise von diesem System und seinen Gliedern mitbestimmt werden. Dabei wird der Einfluß der inneren Faktoren größer sein als der der Umwelt. Es läßt sich z. B. feststellen, daß die Abänderungsmöglichkeiten des Plasmons von den Genen des Zellkernes abhängig sind, wie auch die Genmutation von seiten des Plasmas quantitativ beeinflusst werden kann. Andererseits darf aber nicht übersehen werden, daß gerade dieses System der Zelle mit seinen funktionell aufeinander eingestellten Konstituenten die Abänderungsmöglichkeiten seiner Glieder einschränken wird. Alle Änderungen, durch die die funktionellen Wechselwirkungen zwischen den Systemgliedern beeinträchtigt werden, werden zu Letalität und damit zur Elimination der abgeänderten Konstituenten führen.

b) Weiterhin wird aller Wahrscheinlichkeit nach der Vorgang der Plasmonumkombination durch die Lage der entsprechenden Zellen im Gewebe- und Organverband beeinflusst werden können, wobei diffundierende Substanzen, vor allem Hormone eine Rolle spielen werden. In diesem Zusammenhange sei nochmals an die ungleichmäßige Verteilung mancher Zellinhaltsbestandteile während der Embryonalentwicklung der Tiere erinnert, durch die eine verschiedene Determinierung der Gewebe zustande kommt, die sich aus den entsprechenden Zellbezirken entwickeln. Nachdem ein Teil dieser Determinationen auch bei langer Gewebekultur konstant (vgl. auch Abschnitt 6b, S. 272) erhalten bleibt, läßt sich die Hypothese aufstellen, daß viele dieser Determinationsvorgänge auf dem Wege einer Plasmonabänderung zustande kommen.¹

c) Schließlich können die verschiedenen beeinflussenden Faktoren erst auf der Ebene des Individuums wirksam werden.

Diese Gliederung ist nicht nur von Bedeutung, wenn die eigentlichen Abänderungsvorgänge ins Auge gefaßt werden. Sie muß in besonders hohem Maße bei den Selektionsvorgängen berücksichtigt werden: a) Wirkt sich ein positiver oder negativer Selektionswert eines bestimmten Plasmotyps erst für das ganze Individuum aus, so erfaßt die Selektion nur ganze Individuen und spielt wie bei der Kernvererbung nur in Populationen und Generationenfolgen eine Rolle. b) Wird ein positiver oder negativer Selektionswert aber schon im Gewebe- oder Organverband oder gar schon in der Zelle manifest, so kann die Selektion schon auf Teile eines Individuums übergreifen. Bei dem pflanzlichen Versuchsobjekt des Verfassers dürfte die gerichtete Abänderung der Pflanze, die regelmäßig zu einer Beseitigung der Wachstumshemmungen führt, durch eine solche intraindividuelle Selektion zustande kommen. Bei den Tieren mit ihrer streng koordinierten, geschlossenen Entwicklung dürfte eine Sonderentwicklung neuer Plasmotypen wohl viel schwerer möglich sein. Sie dürfte nur bei einer harmonischen Weiterentwicklung des ganzen Systems im Laufe von Ontogenie und Phylogenie möglich sein¹ oder nach Sprengung der Koordination. Es kann die Annahme gemacht werden, daß an der Krebsentstehung Abänderungen des plasmatischen Erbgutes beteiligt sind und daß manche Tumoren durch das Sonderwachstum von Plasmotypen mit positivem Selektionswert zustande kommen (Michaelis 1948 d, 1949 e).

¹ Es können von hier aus auch Brücken zu Teilen der Weismannschen Keimplasmatheorie und des Haeckelschen phylogenetischen Grundgesetzes geschlossen werden.

5. Über das Auftreten der Plasmovarianten

Die hier erwähnten Abänderungs- und Entmischungsvorgänge werden je nach der Geschwindigkeit der Vorgänge und je nach der Anzahl der beteiligten Erbräger pro Zelle in sehr verschiedener Weise sichtbar werden können. Correns (1937) führte schon ausführlich aus, daß eine Entmischung verschiedenartiger Plastiden um so langsamer vor sich geht und um so längere Zeit nur Zellen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen ergeben muß, je größer die Zahl der Plastiden pro Zelle ist. Diese Überlegungen gelten jedoch nur so lange, als die Entmischung allein vom Zufall abhängig ist und keine direkte Beeinflussung der Entmischung stattfindet.

a) Bei einer schnellen und vollkommenen Entmischung der unterschiedlichen Plasmonkonstituenten, z. B. auf dem Wege einer selektiven Elimination, wird die Abänderung des plasmatischen Erbgutes sprunghaft vor sich gehen und ein Bild geben, wie es in ähnlicher Weise von der Genmutation her bekannt ist.

b) Bei einer langsamen und quantitativen Entmischung zahlreicher Erbkonstituenten ist zu erwarten, daß die Plasmovariation über viele Zwischenstufen gleitend und fließend vor sich geht. Die eingangs geschilderten experimentellen Befunde lassen sich zwanglos auf Grund einer solchen Vorstellung verstehen.

6. Über die Erbkonstanz der Plasmovarianten

Schließlich erscheint es noch wichtig, die Erbkonstanz der auf dem Wege der Plasmonumkombination entstandenen Abänderungen zu betrachten.

a) Bei einer qualitativen, vollständigen Elimination einzelner Sorten von Erbrägern wird der Abänderungsvorgang irreversibel sein. Dementsprechend wird eine Erbkonstanz zum mindesten bei vegetativer Vermehrung so lange festzustellen sein, bis eine neue Mutation auftritt. Bei einer generativen Vermehrung kann eine Erbkonstanz nur dann erwartet werden, wenn das plasmatische Erbgut ausschließlich von der Mutter geliefert wird. Bei den häufigeren Fällen einer Plasmamischung bei der Befruchtung ist eine Erbkonstanz nur möglich, wenn die Kreuzung zwischen gleichen Plasmotypen erfolgt, wenn das väterliche Plasma eliminiert wird oder die ursprüngliche Plasmonkombination einen positiven Selektionswert besitzt.

b) Bei einer quantitativen Abänderung des Mischungsverhältnisses, z. B. durch eine verschiedene Vermehrungsgeschwindigkeit, wird aber der Vorgang der Plasmonumkombination reversibel sein können. Dies ist besonders wichtig, wenn die Abänderung unter dem Einfluß innerer oder äußerer Faktoren vor sich geht. 1. Erfolgt die Plasmonabänderung langsamer als die Änderung der beeinflussenden Faktoren, so kann das Bild einer mehr oder minder lange andauernden Nachwirkung zustande kommen. Liegen äußere Faktoren vor, so kann auf diese Weise eine Dauermodifikation entstehen. Bei der Einwirkung innerer Faktoren kann das Bild einer Prädetermination gegeben sein. Beide Fälle dürften verhältnismäßig häufig vorkommen. 2. Erfolgt schließlich die Plasmonabänderung synchron mit der Änderung des beeinflussenden Faktors, so ist zu erwarten, daß die Abänderung äußerlich einer Modifikation gleicht. Eine Unterscheidung zwischen solch einer Plasmonumkombination und einer Modifikation wird praktisch nur sehr schwer möglich sein. Theoretisch wird sie sich danach richten müssen, ob eine Abänderung der lebenden, identisch reproduzierbaren Zellbestandteile, bzw. ihrer in den Zellen vorhandenen Kombination erfolgt oder nicht, denn die

identische Reproduktionsfähigkeit ist letzten Endes die entscheidende Grundlage für einen Erbvorgang.

Abänderungsvorgänge, wie sie hier geschildert wurden und die zu einer Parallele zwischen „Mutation“, „Dauermodifikation“ und „Modifikation“ führen, sind schon längst, z. B. bei Viren und Bakterien bekannt. Es hat verhältnismäßig lange gebraucht, bis man erkannt hat, daß diese Abänderungen vielfach durch Selektion innerhalb von Populationen entstehen. Bei der plasmatischen Vererbung besteht die Möglichkeit, daß diese Vorgänge auch auf das Individuum übergreifen. Die auffälligen, an den Plasmonabänderungen bei *Epilobium* beobachteten Parallelen zwischen Modifikation, Nachwirkung, Dauermodifikation und Erbänderung finden ebenso wie die gerichtete und die gleitende Abänderung bei der Annahme einer intraindividuellen Plasmonumkombination ihre zwanglose Erklärung.

D. Schluß

Diese Ausführungen über die verschiedenen Möglichkeiten der intraindividuellen Plasmonumkombination müssen an dieser Stelle genügen. Im einzelnen wäre zu den verschiedenen Punkten noch viel zu sagen. Die hier gegebene Aufzählung ist auch in mancher Beziehung noch lückenhaft, und durch Kombination der erwähnten Erscheinungen sind noch mannigfache weitere Abänderungsmöglichkeiten gegeben. Es sollten hier nur die Punkte einer kurzen Besprechung unterzogen werden, die zur Deutung der schon veröffentlichten, experimentellen Befunde wesentlich sind und deren Vorkommen durch diese Befunde wahrscheinlich gemacht wird.

Bei einer ausführlicheren Beschäftigung mit den hier angedeuteten Gedankengängen ergeben sich zahlreiche neue, theoretisch wichtige Perspektiven. Der kurze Hinweis auf das Determinationsproblem mag ein Beispiel hierfür geben. Es zeigt sich dann aber auch, daß noch zahlreiche offene Fragen bestehen, die durch genetische, zytologische und zellphysiologische Untersuchungen zu klären sind. Zweck dieses kurzen Vortrages konnte es nur sein, auf die bisher viel zu wenig berücksichtigte Plasmonumkombination und ihre Bedeutung hinzuweisen und zu weiteren Untersuchungen anzuregen. Die Plasmavererbung wird in der Zukunft zu manchen neuen Impulsen führen. Sie wird infolge der Konstanz der Plasmoneinheiten einerseits und infolge der Veränderlichkeit der plasmatischen Erbsumme andererseits zu einem Bindeglied zwischen Genetik und Physiologie werden.

Literatur

- Brücher, H., 1940, Spontanes Verschwinden von Entwicklungshemmungen eines Arthastades. *Flora* 134, 215—228.
- Correns, C., 1937, Nicht mendelnde Vererbung. *Handb. d. Vererb. Wiss.* Berlin II, H.
- Michaelis, P., 1933, Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an *Epilobium*. II. Die Bedeutung des Plasmas für die Pollenfertilität des *Epilobium luteum* × *hirsutum*-Bastards. *Z. Vererb. L.* 65, 1—71, 353—411.
- 1947, Über die Vererbung der Plasmonvarianten reziprok verschiedener *Epilobium hirsutum-parviflorum*-Bastarde. *Naturw.* 34, 280—281.
- 1948 a, Über einige Abänderungen an reziprok verschiedenen *Epilobium hirsutum*-Bastarden. *Z. Vererb. L.* 82, 197—229.
- 1948 b, Über die gleitende Veränderung des Plasmotypus. *Biol. Zentralbl.* 67, 32—44.

- 1948 c, Über parallele Modifikation, Dauermodifikation und erbliche Abänderung des Plasmons. Z. Naturf. **3 b**, 196—202.
- 1948 d, Zur Theorie der Krebsentstehung. Z. Krebsf. **56**, 165—170.
- und G., 1948 e, Zur Konstanz des Cytoplasmons bei *Epilobium*. Planta **35**, 467 bis 512.
- 1949 a, Über Abänderungen des plasmatischen Erbgutes. Z. Vererb. L. **83**, 36—85.
- 1949 b, Prinzipielles und Problematisches zur Plasmavererbung. Biol. Zentralbl. **68**, 173—195.
- 1949 c, Über plasmoninduzierte Genlabilität. Naturw. **36**, 220—221.
- 1949 d, Über die Beseitigung von Entwicklungsstörungen auf dem Wege der Plasmonabänderung. Züchter **19**, im Druck.
- 1949 e, Über die Beziehungen zwischen Krebsentstehung und plasmatischer Vererbung. Z. Krebsf. **56**, 225—233.
- und Ross, H., 1943, Untersuchungen an reziprok verschiedenen Artbastarden bei *Epilobium*. II. Über Abänderungen an reziprok verschiedenen und reziprok gleichen *Epilobium*-Artbastarden. Flora **137**, 24—56.
- Ternetz, Ch., 1912, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. Jahrb. für wiss. Bot. **51**, 435—514.

Kurze Mitteilungen

Notiz über *Cephalanthera Albinos*

Von

Friedl Mairold und Friedl Weber

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz

(Eingelangt am 8. Juli 1944)

In einem dichten Fichtenwalde am Frauenkogel nördlich von Graz wurden am 25. Juni zwei nebeneinanderstehende albinotische Exemplare von *Cephalanthera Damasonium* (*C. alba*) aufgefunden, ihre Farbe war gelblich-weiß. Jede Pflanze hatte fünf Blätter von normaler Größe und Gestalt ausgebildet und erreichte eine Höhe von etwa 20 cm, Blüten waren nicht vorhanden. In der Nähe stehende normal grüne Pflanzen derselben Art zeigten in Habitus und Größe vollkommen gleiches Aussehen wie die Albinos. Über „blasse“ *Cephalantheren* liegen von Renner (1937, 1942) bereits Berichte vor. Zunächst wurde der Stärkegehalt der albinotischen Blätter untersucht. Das Chlorenchym der grünen Blätter enthält zahlreiche Körnchen autochthoner Stärke, die allerdings äußerst klein und daher selbst in Jodchloralhydrat schwer zu erkennen sind. Im Mesophyll der Albinos ließ sich Stärke dagegen überhaupt nicht nachweisen. Die Schließzellen der Blätter der grünen Pflanzen weisen reichlich Stärke auf, die der Blätter der Albinos aber nur ganz geringe Spuren. Daß in den Schließzellen albinotischer Blätter die „Sparstärke“ sich lange hält, ist von anderen Pflanzen her bekannt (Reuter 1938).

An den Albinoblättern wurden Vitamin-C-Bestimmungen nach der Methode Tillmans durchgeführt und der Vitamin-C-Gehalt dabei mit 52 mg% bezogen auf das Frischgewicht ermittelt. Der entsprechende Wert grüner *Cephalanthera*-Blätter betrug 114 mg%. Es stimmt also das Verhalten der weißen *Cephalanthera* mit dem der Albinos anderer Pflanzen gut überein, von denen bekannt ist, daß sie wesentlich weniger Ascorbinsäure enthalten als ihre grünen Artgenossen.¹ Während bei streng C-autotrophen Pflanzen ein solcher Chlorophylldefekt zu einem sich letal auswirkenden Faktor wird und Albinos sich nicht über das von den Samenreserven zehrende Keimlingsstadium hinaus weiter entwickeln können,

¹ Von der Regel, daß chlorophyllfreie Blätter weniger Ascorbinsäure enthalten als grüne, gibt es allerdings auch Ausnahmen. So wurde am 30. Juni 1944 der Vitamin-C-Gehalt weißer Blätter von *Chamaebuxus alpestris* mit 114 mg% bestimmt, der Gehalt grüner Blätter mit 88 mg%. Die albinotische Pflanze wurde am Lineck bei Graz aufgefunden, die Blätter des vorigen Jahres waren grün; die Vergleichsbestimmung erfolgte ebenfalls an diesjährigen Blättern einer normal grünen Pflanze.

wuchsen die *Cephalanthera-Albinos* zu völlig normal gestalteten Pflanzen heran. Diese humusbewohnende Orchidee kann sich also anscheinend auch C-heterotroph (als „Holosaprophyt“) mycotroph ernähren, wenn sie einen albinotischen Chlorophylldefekt erleidet, denn es ist wohl nicht anzunehmen, daß die beiden offenbar einem Rhizom entspringenden beblätterten Pflanzen sich lediglich auf Kosten von Reservestoffen ernährt haben, die in den vorausgehenden Vegetationsperioden im Rhizom aufgespeichert worden sind. Ziegenspeck (1936) gibt an, daß *Cephalanthera alba* an ihren Standorten auch eine Zeitlang „latent“ sein kann. Wenn nämlich der Nadelwald zu dicht (lichtarm) wird, so verschwindet sie, um beim Lichterwerden wieder über dem Boden zu erscheinen. Ziegenspeck bezeichnet dies als einen „Rückschritt zur Vollmycotrophie der Jugend“. Das würde bedeuten, daß *Cephalanthera alba*, wenn der Lichtgenuß zu gering wird, so daß sie nicht mehr genügend assimilieren kann, auch nicht mehr über dem Boden erscheint, um so erstaunlicher ist es, daß im Falle des Chlorophylldefektes, der eine Photosynthese ja ganz ausschließt, normal entwickelte Pflanzen ausgebildet werden. Auch *Neottia* kann im Dunkeln voll zur Entwicklung kommen (Weber 1920), dieser Saprophyt soll allerdings infolge Inaktivität seiner einzigen Chlorophyllkomponente auch in Licht nicht zu assimilieren vermögen (Montfort 1940).

Beachtenswert ist, daß die albinotische *Cephalanthera*, wenn auch im Vergleich zur grünen nur wenig, absolut genommen doch ziemlich viel Ascorbinsäure enthält. Dieser Befund verdient Interesse in Hinblick auf die oft erörterte Frage, ob die Chloroplasten in der Pflanze die primäre Bildungsstätte des Vitamin C darstellen. Chloroplasten lassen sich in den *Cephalanthera-Albinos* weder im Mesophyll noch in den Schließzellen nachweisen, auch nicht mit Hilfe von Silbernitrat, worin sich nach Molisch (1918) die Chloroplasten schwärzen und selbst die aller kleinsten chlorophylltragenden Plastiden auffinden lassen (Ruhland & Wetzel 1924). Keller (1930) gibt unter den „Monstrositäten“ von *Cephalanthera alba* ebenfalls „Pflanzen ohne Chlorophyll“ an. Die *Cephalanthera-Albinos* haben also wohl die Fähigkeit, Ascorbinsäure auch ohne Chloroplasten zu bilden, und zwar in den Blättern, denn daß der Wurzelpilz dieses Vitamin liefert, ist nicht anzunehmen. Es sei in diesem Zusammenhange daran erinnert, daß nach Moldtmann (1939) die chlorophyllfreien parasitischen Blütenpflanzen *Lathraea* und *Orobancha* keine Ascorbinsäure enthalten. Weber (1940) gibt den Vitamin-C-Gehalt von *Neottia* mit 41 mg%, den von *Limodorum* mit 8,4 mg% und den von *Corallorhiza* mit 41 mg% an.

Literatur

- Keller, 1930—1940, Monographie der Orchideen Europas und des Mittelmeergebietes. Dahlem.
 Moldtmann, 1939, Untersuchungen über den Ascorbinsäuregehalt der Pflanzen in seiner Abhängigkeit von inneren und äußeren Faktoren. *Planta* 30.
 Molisch, 1918, Das Chlorophyllkorn als Reduktionsorgan. Abh. 1. Herausgegeben von Höfler, Jena.
 Montfort & Küsters, 1940, Saprophytismus und Photosynthese. *Bot. Arch.* 40.
 Renner, 1937, Über blasse, saprophytische *Cephalanthera alba* und *Epipactis latifolia*. *Flora* 132.
 — 1942, Notiz über blasse *Cephalanthera* und *Tozzia*. *Flora* 136.

- Reuter, 1938, Der Stärkegehalt der Schließzellen von *Zea-Albinos*. Protoplasma 31.
Ruhland & Wetzel, 1924, Der Nachweis der Chloroplasten. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 42.
Weber, 1920, Notiz zur Kohlensäureassimilation von *Neottia*. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 38.
— 1940, Vitamin-C-Gehalt von Albinos und panaschierten Pflanzen. Protoplasma 35.
Ziegenspeck, 1936, Orchidaceae. Kirchners Lebensgeschichte der Blütenpflanzen I/4.

Polarisationsmikroskopische Messungen an Mikrosporenmutterzellen von *Tradescantia paludosa*

Von

Hans H. Pfeiffer, Bremen

Aus dem Laboratorium für Polarisationsmikroskopie

(Eingelangt am 26. August 1944)

Vor ungefähr einem Jahrzehnt machten Schmitt und Johnson¹ auf cytoplasmatische Granuli aufmerksam, die in frühen Entwicklungsstadien des männlichen Gametophyten von *Tradescantia* auftreten, mit deren Wachsen aber verbraucht werden und mikrochemisch ein sehr eigenartiges Verhalten zeigen. Gegenüber Reaktionen auf Lipide, Kohlehydrate und Proteine verhalten sie sich negativ, durch Trypsin werden sie verdaut, während Pepsin und Diastase ohne erkennbare Wirkung bleiben, und in Wasser, Salzlösungen und verdünnten Mineralsäuren sind sie unlöslich, während sie in verdünntem Alkali oder auch schon in Wasser von 45 bis 50° C gelöst werden. Die Entdecker sahen in den auch polarisationsoptisch wirksamen Zellbestandteilen hauptsächlich aus Proteinen aufgebaute Gebilde. Deswegen schien ihre eingehende Untersuchung im Vergleich zu den bereits polarisationsmikroskopisch vermessenen Eiweißspindeln² sehr erwünscht. Eine kurze Orientierung in den für solches Nachsuchen so gut geeigneten Vorlesungen Küsters³ ergab keinen einschlägigen Hinweis. Von *Tradescantia* sind allerdings die von Schimper⁴ beschriebenen, relativ großen, kugeligen, stark lichtbrechenden Leukoplasten in der Epidermis ebenso wie die von A. Meyer⁵ behandelten, in Vakuolen frei beweglichen Oxalatkristalle bekannt, welche sich mit einer durch jodhaltige Lösungen bräunenden Hülle umgeben, ohne daß diese deswegen mit Sicherheit als cytoplasmatische Derivate erwiesen werden könnten. Zu welcher unerwarteten Befunden aber dann die eingehende Beschäftigung mit den Ge-

¹ F. O. Schmitt and G. T. Johnson, Ann. Missouri bot. Gard. 25, 455 (1938).

² H. H. Pfeiffer, Protoplasma 36, 616 (1942).

³ E. Küster, Die Pflanzenzelle, S. 408 (Jena 1935).

⁴ A. F. W. Schimper, Jahrb. wiss. Bot. 16, 1, 62 (1885). — Vgl. auch Küster, a. a. O. 258.

⁵ A. Meyer, Morphologisch-physiologische Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere 1, 373 (Jena 1920). — Küster, a. a. O. 398, 400.

bilden in den männlichen Gametophyten geführt hat, sei in dieser Mitteilung kurz gezeigt.

Läßt schon der Ausfall der mikrochemischen Reaktionen, der in allen Fällen bestätigt werden konnte, die Annahme der Proteinzugehörigkeit zweifelhaft erscheinen, so ergibt eine Probe mit Jodjodkalium das Vorkommen von Stärke oder einer Modifikation derselben⁶. Der physiologischen Bedeutung der Inhaltsbestandteile nach scheint es sich also um ein Vorkommen zu handeln, welches dem intraprotoplasmatischer Zellulosekörner vergleichbar ist, wie es Weber van Bosse⁷ für die auf *Pilea* parasitisch lebende Alge *Phytophysa Treubii* gezeigt hat. Aber auch die polarisationsoptischen Befunde sind in mehrfacher Hinsicht überraschend.

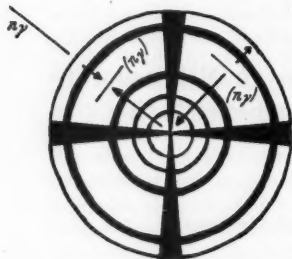


Abb. 1. Bertrandsches Kreuz mit Interferenzringen bei räumlich-zentraler Faserung der Leptonen in orthoskopischer Ansicht der Sphärite. Die Pfeile geben die Richtungen der Verlagerung der Interferenzringe bei Steigerung in einem superponierten Kompensator (nach W. J. Schmidt) an; n_1 bezieht sich auf den Berek-Kompensator im Tubusschlitz, (n_2) auf den Sphäriten.

Zu den Untersuchungen benutzt man die jungen Mikrosporen beispielsweise von *Tradescantia paludosa* in jenem Entwicklungsstadium, in welchem die Trennung der Tetraden eben eingesetzt hat. Zwischen gekreuzten Nicols⁸ ergeben die im Zytoplasma gelegenen Körnchen bei orthoskopischer Betrachtung das Auftreten von vier hellen Sektoren, welche durch ein schwarzes, je nach der Lage des Kernes in der Gestalt etwas wechselndes Brewster- oder Sphäritenkrenz voneinander getrennt sind. Dieses ähnelt dem Hauptisogyrenkrenz optisch-einachsiger Kristalle in konoskopischer Untersuchung. Bei Einschalten eines Gipsblättchens Rot I erscheinen die Arme des Auslöschungskreuzes rot und zwei der Sektoren lebhaft blau, die beiden anderen leuchtend gelb. Bekanntlich verläuft durch die blau gezeichneten Sektoren die längere, durch die gelben die kürzere Achse der Indexellipse des Gipsblättchens. Da die längere Achse der Indexellipse radial streicht, handelt es sich bei unserem Objekt um sogenannte positive

Brewster-Kreuze, womit freilich über den kristallographisch-optischen Charakter der Doppelbrechung noch nichts ausgesagt wird. Nur unter besonders günstigen Beobachtungsbedingungen lassen sich in räumlicher Anordnung ringförmig das Kreuz durchsetzende Interferenzfarben erkennen (Bertrandsches Kreuz). Bei Gebrauch eines Drehkompensators, z. B. nach H. Sénarmont oder M. Berek⁹, erfahren die farbigen (oder bei monochromatischer Beleuchtung schwarzen) Interferenz-

⁶ Vgl. auch K. Yasui and N. Suita, Bot. Magaz. Tokyo 53, 521 (1939).

⁷ A. Weber van Bosse, Ann. Jard. bot. Buitenzorg 8, 165 (1890). — Küster, a. a. O. 415.

⁸ Für die polarisationsmikroskopischen Messungen sei hier verwiesen auf H. H. Pfeiffer, Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin, 40, 47 (Braunschweig 1944).

⁹ Pfeiffer, a. a. O. 53, 58.

ringe anormale Verschiebungen, indem sie sich in zwei Quadranten aufeinander zu, in den beiden benachbarten voneinander fortbewegen (Abb. 1). Das beruht darauf, daß zufolge der räumlich konzentrischen Anordnung der Leptonen in einer vom kugelförmigen Sphäriten tangential abgeschliffenen Kappe wegen der zunehmenden Divergenz der Strahlen gegen die optische Achse der Leptonen der Gangunterschied von der Mitte aus zunächst ansteigt, dann aber mit abnehmender Dicke der Kappe nach dem Rande wieder sinkt. Indem sich jene Quadranten, in welchen sich die Interferenzkurven bei Steigerung des Gangunterschiedes im Kompensator aufeinander zubewegen, in Subtraktionslage zu dessen Schwingungsrichtungen befinden, läßt sich daraus der optische Charakter der mikroskopisch nicht auflösbaren Leptonen der Sphärite als positiv erschließen.

Für Messungen der Anisotropie derartiger sphäritischer Körper haben wir eine geeignete Beziehung in der von Frey-Wyssling¹⁰ abgeleiteten Näherungsformel

$$(n_o - n_a)_D = \Gamma_{\max} / 1,122 \, r,$$

worin Γ_{\max} den maximal bestimmten Gangunterschied, r den Radius der Kugel und der Ziffernwert eine spezifische Konstante darstellt.



Abb. 2. a Brewster-Kreuz eines untersuchten Granulum zur Ermittlung des Radius r — b der maximale Gangunterschied Γ_{\max} des gerade vermessenen Quadranten, nicht aber des ihm gegenüberliegenden, gerade kompensiert.

Zu den Anwendungsbedingungen der Gleichung gehört, daß die Sphärite in einem Medium mit dem Brechungskoeffizienten zwischen n_a und n_o , bei dem Versuchsobjekt (siehe unten) also zwischen 1,5366 und 1,5271, gemessen werden. Als gut geeignet haben sich hierfür Mischungen erwiesen, welche beim Verdünnen von Benzylalkohol (n_D 1,5376) mit Cyclohexanol (n_D 1,4645) erhalten werden.

Meßfehler, welche durch den gekrümmten Verlauf des außerordentlichen Strahles, für welche sich die Lichtbrechung beständig ändert, entstehen, bleiben wegen des nur geringen Wertes der Doppelbrechung — nämlich gemäß der hier nicht zu behandelnden Bestimmung der beiden Brechungskoeffizienten n_a , n_o nach der Beckeschen Methode¹¹: 0,0092 bis 0,0098 — zu vernachlässigen.

Wenn man nach Bestimmen des Radius mit dem Okularmikrometer (Abb. 2a) mittels eines Drehkompensators (nach Berek oder Sénarmont) kompensiert, ver-

¹⁰ A. Frey-Wyssling, Ber. Schweiz. bot. Ges. 50, 321, 326 (1940). — H. Speich, Dissert. E. T. H. Zürich, S. 7 (1941). — W. J. Schmidt, Protoplasma 37, 86, 92 (1942). — Pfeiffer, a. a. O. 39.

¹¹ W. J. Schmidt, Handb. biol. Arbeitsmeth. (V) 10, 827, 855 (1935). — Vgl. H. H. Pfeiffer, l. c. 69 f.; Experimentelle Cytologie, S. 55 (Leiden and Waltham 1940).

schwindet das schwarze Brewster-Kreuz; doch wird gerade dadurch eine Verwechslung mit den durch das Kompensieren schwarz werdenden Stellen vermieden. Bei vollständigem Kompensieren erscheinen die beiden Quadranten in der Subtraktionsstellung dunkel und bilden die Achsen der beiden keilförmigen Schatten eine Gerade (Abb. 2b). Wenn jetzt doch noch ein Winkel zwischen ihnen auftritt, so ist beim Kompensieren nicht von der genauen 45° -Stellung des Kornes ausgegangen worden (die ja wegen der fast kugeligen Gestalt des Objekts kaum jemals sofort exakt gefunden wird) und muß durch Drehen des Objektisches korrigiert und die Messung sogleich wiederholt werden. In manchen Fällen kann übrigens — als Folge einer nur so sich zeigenden geringen Abplattung des Sphäriten — der einem vermessenen Quadranten gegenüberliegende Quadrant nicht gleichzeitig voll-

Tabelle 1.

Meßbefunde und die daraus zu ermittelnde Doppelbrechung $(n_a - n_o)D$

r	Sénarmont-Kompensator		Berek-Kompensator	
	Γ_{\max}	$(n_a - n_o)D$	Γ_{\max}	$(n_a - n_o)D$
0,6	0,65	0,0096	0,7	0,0103
0,8	0,85	0,0094	0,9	0,0100
0,9	0,95	0,0094	0,95	0,0094
1,2	1,3	0,0096	1,3	0,0096
1,3	1,4	0,0095	1,35	0,0092
1,4	1,5	0,0095	1,45	0,0093
1,6	1,7	0,0094	1,65	0,0092
	arithm. Mittel: 0,0095		arithm. Mittel: 0,0095	

kommen kompensiert werden (Abb. 2b). Zum Unterschied von Messungen an Stärkekörnern kommen aber so stark abgeplattete Körner bei dem hier geprüften Objekt nicht vor, daß sie von den Messungen ausgeschlossen werden müßten, weil die nach der Methode Frey-Wysslings ermittelten Werte der Doppelbrechung sonst zu klein ausfallen würden.

Infolge der geringen Abweichungen der untersuchten Körner von idealer Kugelgestalt findet sich beim Vergleich der Messungsbefunde (siehe Tabelle 1) eine recht geringe Streuung selbst beim Vermessen von Granuli sehr ungleicher Größe. Als arithmetisches Mittel von 15 Einzelmessungen jeweils einer übereinstimmenden Größenklasse hat sich die positive Anisotropie der Granuli zu $0,0096 \pm 0,0001$ mit dem Sénarmont-Kompensator, bzw. $0,0094 \pm 0,0002$ mit jenem nach Berek ergeben. Die Anisotropie der Objekte ist also von derselben Größenordnung wie jene von Quarz oder Gips (vgl. die auszugsweise mitgeteilten Werte in Tabelle 2). Die nicht unerheblichen Abweichungen von den von Schmitt und Johnson angegebenen Werten erklären sich aus der von uns angewandten verbesserten Bestimmungsformel Frey-Wysslings, deren Eignung Pfeiffer¹² durch vergleichende Messungen an verschiedensten sphäritischen Materialien andernorts bereits nachgewiesen hat. Bei Gebrauch des Berek-Kompensators ist die Streuung unter den ermittelten Werten aus unbekannten Gründen etwas größer als bei Verwendung eines Sénarmont-Kompensators. Störungen in der Anordnung der

¹² H. H. Pfeiffer, Blätt. Unters.- u. Forsch.-Instr. 17, 8, 11 (1943).

Leptonen innerhalb eines Sphäriten als Folge von Drücken sind relativ selten; beim Drehen des Objektisches verraten sich solche Abweichungen sogleich dadurch, daß sich die Brewster-Kreuze in zwei Hyperbeln öffnen (Ähnlichkeit mit konoskopischen Interferenzbildern zweiachsiger Kristalle).

Tabelle 2.

Vergleich der Anisotropie ($n_a - n_o$)^D verschiedener biologischer und kristallographischer Materialien

Granuli ♂ Gametophyten (<i>Tra-</i> <i>* descantia paludosa</i>)	0,0095	Myosinfäden, alkoholfixiert . . .	0,003
Stärkekörner (<i>Solanum tubero-</i> <i>sum</i>)	0,0116	Musc. sartorius, frisch isolierte Faser: <i>Rana</i>	0,0019
Zellwand der Faserzellen: <i>Boeh-</i> <i>meria tenacissima</i>	0,0677	Musc. abd. int. pars thorac., <i>Lacerta</i>	0,00181
ebenso: <i>Urtica dioica</i>	0,062	Musc. semitendinosus: <i>Rana</i> . . .	0,00175
ebenso: <i>Cannabis sativa</i>	0,055	Chromatin der Speicheldrüsen- chromosomen: <i>Chironomus</i> , interpol.	0,0002
ebenso: <i>Corchorus spec.</i>	0,041	Quarz	0,009
Cellulosefäden: Samen von <i>Co-</i> <i>baea scandens</i>	0,047	Gips	0,009
N. ischiadicus, 6,5 μ dick: <i>Rana</i> .	0,0101	Muscovit	0,042
ebenso: 4,6 μ dick	0,0091	Calcit	0,172
Retinastäbchen: <i>Rana</i>	0,0017		
Musc. sartorius, alkoholfixiert: <i>Rana</i>	0,003		

Bemerkenswert — zumal im Vergleich zum entsprechenden Verhalten der Stärkekörner von *Solanum* nach Frey-Wyssling¹³ — sind Änderungen der optischen Anisotropie beim Pressen der Objekte unter dem Deckglas. Dabei vergrößert sich ihr Durchmesser oft erheblich und nimmt im Innern die Doppelbrechung mehr und mehr (bis zur Isotropie) ab. Auch wenn es niemals geglückt ist, etwa wie an den damit zu vergleichenden Stärkekörnern, durch verstärkten Druck und Zerquetschen in Kanadabalsam neben einem isotropen Innern einen schwach positiven, breiteren Rand und einen diesen umgebenden schmalen, stärker negativen zu erhalten, müssen wir wohl annehmen, daß die Anisotropie der untersuchten Granuli ähnlich wie die von Mesophasen relativ leicht variiert werden kann, d. h. daß die Körner aus einem ziemlich zart gebauten, der Zerstörung durch mechanische Kräfte leicht zugänglichen Molekulargerüst aufgebaut werden. Daß entgegen Frey-Wyssling die negative Doppelbrechung an der Peripherie der Körner nicht auf einem elasto-optischen Effekt (Spannungsdoppelbrechung)¹⁴ beruhen kann, folgt schon aus der Definition dieses Phänomens, das mit zeitlicher Begrenzung der hervorgerufenen Spannung ebenfalls beendet sein müßte. Wenn nur selten in dem isotropen Innenraume konoskopisch das Achsenbild eines optisch einachsigen Körpers konstatiert werden kann, so rührt das offenbar davon her, daß gewöhnlich entweder der Läsionsdruck bis zur Erzielung statistischer Isotropie nicht mehr ausreicht oder die vom polarisierten Licht durchlaufene Schicht nicht

¹³ Frey-Wyssling, a. a. O. 332.

¹⁴ Vgl. aber H. H. Pfeiffer, Naturwiss. 32, 44 (1944).

genügend dick ist. Daß aber die vertretene Deutung der Reduktion der Anisotropie bei Einwirken von Drücken das Richtige trifft, scheint die mehrfach gemachte Erfahrung zu beweisen, daß durch Verquellen in Wasser die aufgehobene oder verringerte (positive) Doppelbrechung des Korninnern restituiert oder verstärkt wird (Wiederauftreten des Brewster-Kreuzes). Der Ablauf dieses Versuches erinnert lebhaft an das ebenso gedeutete vorübergehende Auftreten einer sphäritischen Struktur in den in wässrigem Medium verquollenen Mannakörnern aus Knollen von *Amorphophallus konyak*¹⁵.

Zusammenfassung

Die in jungen Mikrosporen von *Tradescantia paludosa* vorübergehend auftretenden geformten Zellbestandteile erweisen sich als ein Stärkederivat und bestehen aus optisch positiven Leptonen, welche durch radiale Anordnung zu positiven Sphäriten aggregiert sind. Die aus Messungen der maximalen Gangunterschiede ermittelten Werte der Doppelbrechung führen zu derselben Größenordnung wie bei der Doppelbrechung von Quarz oder Gips. Die Streuung der Anisotropie ist nicht nur bei Körpern derselben Größenklasse, sondern selbst bei Vergleich der Werte aller untersuchten Größenklassen nur sehr gering; auch Störungen in der Anordnung der Leptonen als Folge von Drücken und Spannungen sind überaus selten. Bemerkenswerte polarisationsoptische Befunde ergeben sich endlich in Versuchen mechanischen Quetschens und Zerdrückens der Objekte.

Über die Lagerung der Chromoplasten (Beobachtungen an pflanzlichen Haaren)

Von

Ernst Küster, Gießen

(Eingelangt am 7. April 1949)

Die Krone der *Cucurbita*-Blüten ist auf der Innenseite — an den freien Zipfeln wie in der Röhre — dicht mit chromoplastenreichen Haaren besetzt, an deren Spitze Längsteilungen erfolgen, daß umfangreiche Zellenträubchen zustandekommen. Bei manchen Sorten gehen diese Spitzenanteile der Haare früh zugrunde. Zimmermann (1928) hat über diese Haare keine näheren Mitteilungen gemacht. Neben ihnen werden wir von den Haaren einiger Kompositenblüten sprechen, insbesondere den mit Chromoplasten ausgestatteten der Röhrenblüten von *Gaillardia aristata*.

Die Kronenhaare verschiedener Kürbissorten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Chromoplasten nicht unerheblich voneinander; für alle gilt indessen, daß drei Verteilungsweisen gefunden werden: diffuse Verteilung, d. h. die Chromoplasten sind in allen Teilen des Plasmaleibes, auch den Plasmafäden, reichlich anzutreffen und geben der Zelle eine gleichmäßige, sattgelbe Färbung; Querwandstellung, d. h. die Chromoplasten liegen an den Querwänden der zylindrischen Zellen oder häufen sich an einer von ihnen — oder Kernsystrophe, d. h. die Chromoplasten um-

¹⁵ Frey-Wyssling, a. a. O. 334; Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate, S. 282 (Berlin 1938); Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives, 226 (New York, Amsterdam, London, Brussels 1948).

lagern dicht gedrängt den Zellkern¹. Bei manchen Kürbissorten fand ich den ersten Verteilungstypus außerordentlich sinnfällig, bei anderen nur unvollkommen verwirklicht; der zweite Typus war bei vielen Blüten besonders an den Haaren der Kronenröhre schön zu sehen, bei anderen auch an den der Kronenzipfel, oft nur an der basalen Hälfte der vielzelligen Haare; waren die Spitzenanteile der Haare besonders vergänglich, so zeigten ihre Zellen sehr auffällig den dritten Typus, der bei den Haaren aller untersuchten Sorten und an allen Teilen der Krone sehr verbreitet ist.

Es scheint, daß die vom histologischen Charakter der Haarzellen und von ihrem Alter abhängigen „inneren Faktoren“ die Lage der Chromoplasten bestimmen und die wechselnden Außenweltsbedingungen, z. B. das Licht, geringen oder keinen Einfluß auf sie haben.

Unsere Beobachtungen entsprechen den von Schimper mitgeteilten; er fand Chromoplasten vornehmlich in der Epidermis — von den der Haare teilt er nichts mit — und sagt, daß sie ihre Anordnung mit den Phasen der Entwicklung ändern: im fertigen Zustand der Zellen liegen sie beinahe ausschließlich an der Innenwand, in grünen oder noch farblosen Knospen indifferent verteilt oder um den Zellkern gehäuft, in älteren gefärbten Knospen ausschließlich oder vorwiegend an den Seitenwänden; kurz vor der Anthese beziehen sie ihren endgültigen Platz an den Innenwänden (1885, 209). Schimper fand die Stellung der Chromoplasten im Gegensatz zu der der Chloroplasten vom Lichte unabhängig. Daß die Stärke einen maßgeblichen Einfluß auf die Stellung der Chromoplasten gewinnen könnte (Schimper 1885, 206), habe ich bei Cucurbitahaaren, deren Zellen oft sehr stärkereich sind, nicht beobachten können. Fälle, in welchen die Stärkebelastung die Chromoplasten in den physikalisch unteren Teil der Zelle sinken ließe (Senn 1908, 151, 185, 291), habe ich nicht wahrgenommen. Ähnlich wie Schimper äußert sich Senn (1908, 184) über die Lage der Chromoplasten.

Bei allen Versuchen, die Physiologie der Bewegungen aufzuklären, welche die Plastiden zum Zellkern hin oder gesetzmäßig zu anderen Orten führen, wird zu erwägen sein, daß Zellinhaltsbestandteile verschiedenster Art dieselben Wege zurücklegen, denselben Zielen sich nähern und offenbar durch die gleichen Agentien verlagert werden. Es wäre unzulässig, bei finalen Betrachtungen, die Plastiden fänden in dem Zellkern eine letzte Nahrungsreserve, es gehe von dem Kern eine chemotaktische Wirkung auf die Plastiden aus, der Kern scheine an der Stärkesynthese der ihn aufsuchenden Plastiden beteiligt usw. (Schimper 1885; Senn 1908) stehen zu bleiben, anstatt nach physikalischen Erklärungen zu suchen, welche den Verlagerungen aller zum Kern oder zu anderen bevorzugten Orten wandernden Bestandteile, der toten wie der lebendigen, Rechnung tragen.

Viele Objekte sind seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchung geblieben, weil bei ihren Zellen diejenigen plasmatischen Zustände oder Vorgänge, die zur Verlagerung der Plastiden führen, durch experimentelle Änderung der äußeren Bedingungen sich schnell und zu-

¹ Kernsystopie soll diejenige Systopie heißen, die sich um den Kern der Zelle schart. Da ich zwischen einer solchen und einer an kernfreien Orten der Zelle eintretenden Protoplasma- oder Plastidenhäufung physikalisch keine grundsätzlichen Unterschiede finden zu können glaube, vermeide ich den Terminus Karyostopie (vgl. Tischler 1943, 274) und nähere mich mit meiner Bezeichnungsweise der von Schimper gewählten (1885, 220; vgl. auch Senn 1908, 70, Anm.).

verlässig herbeiführen lassen. Gegenüber den Chromoplasten der *Cucurbita*-haare gelingen solche Versuche nicht; wohl aber spielen sich Lageveränderungen der Plastiden spontan während der normalen Zytogenese ab, zu der wir auch die Vorgänge des physiologischen Alterns einbeziehen.

Ich habe bereits früher (1910) den Versuch gemacht, die Bewegungen der Zelleinschlüsse auf ihre physikalischen Eigenschaften und die des Plasmas, in dem sie liegen, zurückzuführen: Bei der Kernsystrophe — ebenso wie bei jeder vom Zellkern unabhängigen Häufung der Plastiden sind vermutlich Wirkungen der Oberflächenspannung im Spiele; die Plastidensubstanz der Zelle vermindert ihre Oberfläche, indem die Plastiden sich aufeinanderhäufen; wird der Kern zum Zentrum der Häufung, so mögen beim Ansammeln des Zellinhaltes wiederum Oberflächenspannungen wirksam sein. Die Kernsystrophe erweist sich als unabhängig von der Lage des Kerns: Gleichviel ob er an einer Quer- oder Außenwand oder in einem der Plasmafäden frei im Lumen der Zelle liegt oder, von reichlichem Plasma umgeben, mit diesem einen mächtigen, längs verlaufenden Strang bildet, in allen Fällen kann er die Plastiden um sich scharen. Es ist für die Kernsystrophe ohne entscheidende Bedeutung, ob die Plastiden substanzarm sind oder große Stärkevorräte in sich bergen; im zweiten Falle scheint allerdings die Kernsystrophe lockerer auszufallen als bei Häufung substanzarmer Chromoplasten, die sich zu sehr dichter Packung zusammenfinden können.

Nehmen die Chromoplasten ihren Weg zum Zellkern, so ist — gerade bei *Cucurbita* lassen sich diese Verhältnisse gut beobachten — nicht immer eine allseitige gleichmäßige Umschalung des Kerns das Ziel der Bewegungsvorgänge; vielmehr kommt es oft zur Bildung kernständiger großer Plastidengruppen, die als Kugelkalotten oder gleich hemisphärischen oder kegelförmigen Anhängseln dem Zellkern aufsitzen. Die Plastiden verhalten sich dabei nicht anders als die farbigen Niederschläge, die man durch Methylenblau oder Neutralrot in den Zellen erzeugen kann: die Niederschlagspartikel sammeln sich an dem von Chromoplasten bedeckten Zellkern und bilden an diesem eine weitere, mützen- oder kalottenartige Auflage. Was für die Häufung des Protoplasmas und der Plastiden gilt, mag auch für die von Öltropfen (Küster 1935, 411), von Kriställchen, von Entmischungströpfchen natürlich oder künstlich gefärbter Zellen gültig sein.

Schwierigkeiten macht die Frage, was für Faktoren in bestimmten Phasen der Entwicklung unserer Objekte die Häufung ihrer Plastiden an bestimmte Abschnitte der Wand, insbesondere an die Querwände der Haare führen. Bei *Cucurbita* können diese den gesamten Chromoplastenbesitz der Zellen auf sich vereinigen. Sehr oft liegt der Zellkern an einer der Querwände und die Ballung der Chromoplasten an dieser bedeutet dann in der Hauptsache nichts anderes als eine Kernsystrophe — besonders deutlich dann, wenn die kernfreie Querwand keine Chromoplasten auf sich sammelt. Diesen Fällen gegenüber stehen die anderen, in welchen die kernfreie Zellwand keine geringere Chromoplastenbelastung aufweist als die kernführende. Besonders eindrucksvoll sind diejenigen Zellen, deren Querwände von einer dünnen, festgepackten, flachgewölbten Chromoplastenschicht bedeckt sind, welche die ganze Ausdehnung der Wände in Anspruch nimmt. Eine Kontraktion oder systrophische Ballung der Chromoplastenplatte führt zur Häufung der Plastiden in der Mitte der Querwand, deren Randzone allmählich geräumt wird. Die Verdickung der Chromoplastenplatte bleibt bei *Cucurbita* aber bescheiden im Vergleich zu den hemisphä-

risch sich in das Lumen wölbenden Systrophen, wie sie von anderen Haaren her bekannt sind (*Gaillardia* — vgl. Küster 1935, 257), von welchen später noch die Rede sein wird.

Die Bevorzugung der Querwände bei der Verlagerung der Zellinhaltskörper ist eine bei einzellreihigen Objekten weit verbreitete Erscheinung. Ich erinnere an die mit „Ektoplasten“, Zyanophyzinkörnern, auch Gasvakuolen belegten „granulierten“ Querwände der Oscillatoriaceen (*Oscillatoria granulata* usw. — vgl. Geitler 1932, 934, 937, Fig. 609, ferner 963, 964; 1936, 16; siehe auch Kohl 1903, 38); auch diese Inhaltskörper können die ganze Querwand in Anspruch nehmen oder lediglich ihr Mittelfeld. Bei einer großzelligen *Beggiatoa* beobachtete ich hemisphärisch gewölbte Anhäufungen des Schwefels in der Mitte der Querwände; allerdings lag in jeder Zelle nur an einer Querwand ein Schwefelhügel, und zwar auf der dem Wundende des Fadens zugewandten Seite. Vielleicht dürfen auch die von Servetazz (1909, 335, Fig. 112) beschriebenen schmalen Wände der gestreckten Zellen aus dem Samen von *Shepherdia* und die sie besetzenden kristallinen Ablagerungen hier erwähnt werden.

Was für Faktoren die Chromoplasten der Kürbishaare bestimmen mögen, die Querwände zu bevorzugen und die Außenwände zu meiden, bleibt unklar. In erster Linie die chemischen Wirkungen, die von den Nachbarzellen ausgehen und das den Querwänden anliegende Protoplasma unter andere Bedingungen bringen als das der Außenwände, als wirksam anzusprechen, kann ich mich nicht entschließen; hie und da findet man Haare, in welchen eine oder mehrere Zellen abgestorben und kollabiert sind — die Reihe der lebendigen Zellen hat also ihre Kontinuität und die dem Trauma anliegenden Zellen haben ihre zylindrische Form verloren, da die ihm zugewandten Querwände sich stark vorgewölbt haben. Auch in solchen plankonvexen oder bikonvexen Zellen bleibt die Chromoplastenlagerung unverändert. Solche Objekte machen es zugleich unwahrscheinlich, daß der Formunterschied zwischen ebener Quer- und zylindrisch gewölbter Außenwand über die Chromoplastenlagerung entscheide. Man könnte erwägen, ob die kapillaren Wirkungen, welche die Vakuole zur Kugelform drängen, in pathologisch veränderten Zellen, deren plasmatischer Wandbelag sich durch jene leicht verdrängen läßt, den Wandbelag um seine normale gleichmäßige Dicke bringen und in der Mitte langgestreckter Zellen zu einer dünnen Schicht reduzieren, das Protoplasma aber oben und unten zu einer dicken Kappe sich sammeln lassen; auf diese Weise könnten die Plastiden an die Schmalseiten der Zellen abgeschoben werden. Derartige Verdrängungen sind an pathologisch veränderten Zellen (*Helodea* usw.) leicht zu finden; auch Senn gibt manche Abbildungen, deren Objekte möglicherweise durch die hier geschilderten Verlagerungen die dargestellten Eigenschaften angenommen haben (1908, vgl. z. B. Fig. 59 a). Für unser Objekt und seine Chromoplasten kommt dieser Erklärungsversuch nicht in Betracht; außer der Form der Chromoplastenplatten widerspricht ihm namentlich der Umstand, daß auch dort, wo die Breite der Zellen größer ist als ihre Höhe (bis fünfmal so breit!) die Chromoplasten keineswegs an die Außenwände gedrängt erscheinen, sondern an den Querwänden sich häufen.

Die entscheidenden Eigenschaften der Quer- und Außenwände liegen vielleicht in den Wirkungen des Streckungswachstums auf die zylindrischen Außenwände und die ihnen anliegenden Plasmanschichten begründet. Solche Wirkungen kommen offenbar in der Plasmakonfiguration vieler Zellen zum

Ausdruck, wenn in diesen ein längs verlaufender zentraler Protoplasmastrang sich entwickelt und erhält. Auch in den Zellen der *Cucurbita*-Haare spielt dieser seine Rolle — gleichviel ob es sich um flache, scheibenähnliche oder um hohe, um plasmareiche oder plasmaarme Zellen handeln mag.

Es darf angenommen werden, daß an den zwischen zwei Plasmakörpern entstandenen Querwänden und den ihre Protoplasten von der Außenwelt trennenden Wänden zwischen Membran und Protoplasma wesentlich unterschiedene Beziehungen bestehen — wie sie z. B. bei der Plasmolyse und an der Lage der positiven und negativen Plasmolyseorte erkannt werden. Auch diese Unterschiede sind vielleicht bei der Bevorzugung der Querwände seitens der Plastiden nicht ohne Bedeutung.

Alle Versuche, durch äußere Einflüsse die Chromoplasten zu gesetzmäßigen Umlagerungen zu veranlassen, blieben erfolglos, legten aber die Annahme nahe, daß bei schädigenden Einwirkungen die Querwandstellung der Chromoplasten in die kerngebundene Systrophe übergeht. Doch war das Verhalten der *Cucurbita*-Haare allzu wechselnd, als daß ich zuverlässige Schlüsse aus dem nach Verdunkelung, direkter Besonnung, Trauma, Behandlung mit hypertonischen Mitteln und Zuführung von Wasser beobachteten Verhalten hätte ziehen können.

Ich möchte im folgenden zunächst über die Chromoplastenanordnung in den Haarzellen der Röhrenblüten von *Gaillardia* berichten.

Die langzylindrischen Haarzellen von *Gaillardia* sind vor allem an ihren Außenwänden mit Chromoplasten dicht belegt, so daß ein gleichmäßiger goldbrauner Hohlzylinder von ihnen gebildet wird. An den Querwänden liegt zumeist eine kleinere Schar von Chromoplasten; sie beschränkt sich oft auf den mittelsten Teil der Querwand, an der ein die Zelle längs durchziehender Plasmafaden inseriert zu sein pflegt; hier häufen sich die Chromoplasten nicht anders zu kleinen zipfel- oder kugelhappenähnlichen Gruppen wie bei den oben behandelten Objekten die Farbstoffniederschläge an dem den Kern verlassenden Strängen. Beziehungen zwischen Plasmafäden und Chromoplasten einerseits, den plasmatischen Eigenschaften der Zelle andererseits, lassen sich bei *Gaillardia* daran erkennen, daß an den durch Chromoplastenhäufchen und Plasmafäden ausgezeichneten Stellen der Querwände bei der Plasmolyse negative Plasmolyseorte liegen oder ein „Hechtscher Faden“ sich spinnt oder beim Zerreißen des Plasmaleibes eine kleine, mit Chromoplasten erfüllte Portion in der Mitte jener Querwand hängen bleibt. Wir dürfen schließen, daß die Beschaffenheit des den Querwänden anliegenden Protoplasmas und seine Beziehungen zur Membran nicht dieselben sind wie an den Längswänden.

Die Haare der *Gaillardia* lassen die Abhängigkeit der Chromoplastenbewegungen von den Einwirkungen der Außenwelt leicht nachweisen. Als wirksam erweist sich die Behandlung mit wasserentziehenden Mitteln, deren Wirkung auf photosynthetisch tätige und auf farblose Plastiden bereits wiederholt untersucht worden ist (vgl. Küster 1905, 1906, 1910; Senn 1908, 131). In 0,2–0,5 *n*-Lösungen von Rohr- und Traubenzucker, Kaliumnitrat und Harnstoff² sieht man binnen wenigen Stunden die Chromo-

² Da der Inhalt der Haarzellen wegen der geringen Permeabilität der Kutikula vorzugsweise von der Basis der Haare her vom Plasmolytikum erreicht wird, darf angenommen werden, daß die auf die mittleren oder oberen Zellen der Haare wirkende Konzentration erheblich geringer sein kann als die dem ganzen Präparat gebotene.

plasten der Außenwand nach deren Mitte zu einem braunen Gürtel zusammenrücken; diese Bewegung kann mehr als 24 Stunden anhalten.

Zuweilen sieht man mehrere Chromoplastengürtel (2—5) in der Zelle erscheinen; man findet gelegentlich Haare, deren Zellen fast sämtlich gebändert sind — und findet andere, die nur in einer oder in zwei Zellen periodische Verteilung der Plastiden erkennen lassen.

Das Zustandekommen der Gürtel ist keineswegs von Plasmolyse abhängig; auch Zellen, deren Protoplasma durchweg mit seiner Membran in Verbindung geblieben ist, können solche entwickeln. Hieraus geht hervor, daß die Verkürzung der chromoplastenführenden Strecken nicht dadurch zustande kommt, daß das sich plasmolytisch zusammenziehende Protoplasma seine Chromoplasten zusammenrafft. Solche Erscheinungen sind zwar häufig anzutreffen, ähneln aber den von uns bisher beschriebenen nur wenig; wenn die Kappe des sich kontrahierenden Protoplasten zusammenrafft, entsteht an ihr eine dunkelbraune, sphärisch umgrenzte Chromoplastenhäufung, die sich bei den Gürtelbildungen niemals findet, so daß diese auch nach Rückgang etwa vorangegangener Plasmolysen sich leicht von den Raffungshaufen unterscheiden lassen.

Geht die Einengung der Chromoplastengruppen sehr weit (24 Stunden und mehr!), so entsteht ein schmaler, aus dicht gedrängten Chromoplasten bestehender undurchsichtiger Gürtel, der nur noch $\frac{1}{8}$ oder noch weniger der Protoplastenlänge mißt. Wenn an dieser Stelle reichlich Protoplasma und zugleich der Kern liegen, so entsteht ein Chromoplasten erfüllter Pfropf, der den Zellsaftraum in zwei Teile zerlegt.

Bei der Durchsicht sehr vieler Präparate konnte ich mich des Eindruckes nicht erwehren, daß die Ballung zur Systrophe einer stärkeren Schädigung der Zelle entspricht als die Gürtelbildung.

Eine dritte Verteilungsform bringt die Chromoplastenbelastung der Plasmafäden. Der die Zelle der Länge nach durchziehende Plasmastrang kann dicht mit Chromoplasten belegt sein und den weitaus größten Anteil des Plastidenbesitzes der Zelle auf sich vereinigen. Bilder solcher Art habe ich wiederholt beobachtet, doch stets nur in vereinzelten Haaren. Auch diese Verteilungsform steht den Kernsystrophen nahe, da in dem Strang, den die Chromoplasten bedecken, der Kern sich verbirgt.

Schließlich wäre die Bedeckung der Querwände mit Chromoplasten zu erwähnen. In den Sommer- und Herbstuntersuchungen 1944, deren Befunde die vorliegenden Seiten schildern, habe ich niemals so stark gehäufte Querwandchromoplasten gefunden wie früher (Küster 1933, 257, Abb. 121); sehr oft sind mir aber flache Chromoplastenbeläge begegnet und solche, die sich in der Mitte der Querwände zu hohen Zipfeln türmten. Querwandstellung fand ich bei *Gaillardia* als besondere Form der Kernsystrophe dann, wenn der Zellkern einer Querwand anlag; ich fand sie in vielen anderen Fällen symmetrisch in ungefähr gleicher Stärke an beiden Querwänden entwickelt, und schließlich auch Zellen, die typische Gürtel entwickelt hatten, die Chromoplasten ihrer Querwände aber nicht hergegeben hatten.

Ich erwähnte bereits, daß man bei den *Gaillardia*-Haaren eine der soeben beschriebenen Verteilungsformen leicht erhalten kann, wenn man die Haare mit schwach hypertonischen Lösungen behandelt. Unbekannt bleibt, was für Bedingungen in den Zellen verwirklicht sein müssen, damit diese oder jene der beschriebenen Formen erscheint. Zur ursprünglichen Ver-

teilungsform die Chromoplasten zurückkehren zu lassen, gelingt schwerer — wohl habe ich zuweilen nach Beseitigung der angewandten Lösungen und Zusatz von reinem Wasser die eine oder die andere Gürtelbildung ein wenig zurückgehen sehen; Systrophen zu zerstreuen, wollte nicht gelingen. Es scheint, daß die ursprünglich die Zellen beherrschende Außenwandlage der Chromoplasten leichter gestört werden kann als die systrophisch geballte Verteilungsform; jene gleichen einem labilen, diese einem stabilen Gleichgewicht. Bei den *Cucurbita*-Haaren werden stets Kernsystrophe und Querwandpositionen gefunden, niemals diejenige, die wir als labile Verteilungsform für die *Gaillardia*-Haare beschrieben haben.

Die Mannigfaltigkeit der in den *Gaillardia*-Zellen beobachteten Verteilungsbilder und der Umstand, daß an Haaren des nämlichen Präparats und an Zellen desselben Haares so stark unterschiedene Verteilungen unter denselben äußeren Bedingungen sichtbar werden, erschweren die Ermittlung der Bedingungen, welche dieses oder jenes Verteilungsbild bewirken; wirksamer, als die vom Beobachter angewandten, sind offenbar die inneren Bedingungen, die in den Zellen walten. Wie die an *Cucurbita* gesammelten Erfahrungen legen auch die für *Gaillardia* mitgeteilten die Vermutung nahe, daß Unterschiede im querwand- und im außenwandständigen Protoplasma, die ihrerseits mit dem Längenwachstum der Zellen zusammenhängen, das Verhalten der in jenem und diesem liegenden Chromoplasten erklären helfen. Wenn die *Gaillardia*-Chromoplasten zu einem „Gürtel“ oder Pfropfen zusammenrücken, sind wahrscheinlich ebensolche Kapillariätswirkungen maßgebend wie bei jeder anderen systrophischen Plastidenhäufung. Die Betrachtung der Plastidengürtel erinnert an die Verkürzung und Entspannung eines gedehnten Hohlzylinders; vielleicht ist die Vermutung zulässig, daß in dem wandständigen Plasma der durch Streckungswachstum vergrößerten Zellen Spannungen herrschen, die bei osmotischem Wasserentzug verschwinden. Ich habe auf diese Erklärungsmöglichkeiten bereits früher (Küster 1935, 32) hingewiesen³.

Vollends die Entwicklung mehrerer Plasma- und Plastidengürtel und gebänderte Häufung des lebendigen Zellinhaltes bedarf der kausalen Erklärung. Gürtelbildungen des lebendigen Protoplasmas sind für plastidenfreie Zellen bereits bekannt — ich nenne die Gürtel der *Bryopsis*-Fäden (Küster 1935, 32) und die grünen Bänder stark belichteter *Helodea*-Zellen (Küster 1929, 76 ff.), für farblose Zellen die gebänderten Fruchthyphen von *Phycomyces*, welche Kirchheimer (1933) beschrieben hat.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu den Chloroplasten können die Chromoplasten (Untersuchungen an den Haaren von *Cucurbita* und *Gaillardia*) nicht zu phototaktischen Orientierungsbewegungen veranlaßt werden. Wie die Chloroplasten oder andere zur Assimilation befähigte Plastiden lassen sich indessen die Chromoplasten von *Gaillardia* durch Behandlung mit wasser-

³ Von weiteren Objekten, die den genannten ähnlich sind, nenne ich noch die einzelligen Haare der Krone von *Columnnea hirta* (Gesneriaceae). Sie enthalten kleine Chromoplasten. Diese liegen an den Außen- und Querwänden — an ersteren in großen, auffallend gleichmäßigen Abständen, an letzteren unmittelbar nebeneinander zu einer dichten Platte vereint. Versuche über Stellungsänderungen wurden nicht ausgeführt.

entziehenden Mitteln zu Bewegungen veranlassen: sie suchen Gürtelstellung an den Längswänden der Haare auf. Die Häufung der Chromoplasten am Zellkern und ihre Abwanderung von den wandständigen Plasmabelägen zu den Plasmasträngen sowie ihre Häufung an den Querwänden, insbesondere an ihren Mittelfeldern lassen sich vorläufig nicht durch Außenweltfaktoren experimentell hervorrufen. — Die Chromoplasten von *Cucurbita* ließen sich durch Behandlung mit wasserentziehenden Mitteln nicht zur Verlagerung bringen.

Literatur

- Biedermann, W., 1924, Über Wesen und Bedeutung der Plasmalipoide. Pflügers Arch. f. ges. Phys. 202, 223.
- Geitler, L. v., 1932, Cyanophyceae. Rabenhorsts Kryptogamenflora 14, Leipzig.
- 1936, Schizophyceen. Linsbauers Handb. d. Pflanzenanat. 6, Berlin.
- Kirchheimer, Fr., 1933, Protoplasma und Wundheilung bei *Phycomyces*. Planta 19, 574.
- Kohl, F. G., 1903, Über die Organisation und Physiologie der Cyanophyceenzelle und die mitotische Teilung ihres Kernes. Jena.
- Küster, E., Über den Einfluß von Lösungen verschiedener Konzentration auf die Orientierungsbewegungen der Chromatophoren. Ber. d. D. Bot. Ges. 23, 254.
- 1906, Über den Einfluß wasserentziehender Lösungen auf die Lage der Chromatophoren. Vorl. Mitt. Ber. d. D. Bot. Ges. 29, 255.
- 1910, Über Inhaltsverlagerungen in plasmolysierten Zellen. Flora 100, 267.
- 1929, Pathologie der Pflanzenzelle. I. Pathologie des Protoplasmas. Protoplasmanomogr. 3, Berlin.
- 1935, Die Pflanzenzelle. Jena.
- Schimper, A. F. W., 1885, Untersuchungen über die Chorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. Jahrb. f. wiss. Bot. 16, 1.
- Senn, G., 1908, Über Gestalts- und Lageveränderungen der Pflanzen-Chromatophoren. Leipzig.
- Servettaz, C., 1909, Monographie der Elaeagnaceen. Beih. z. Bot. Zbl. 25, Abt. I, 1.
- Tischler, G., 1934, Allgemeine Pflanzenkaryologie. 1. Hälfte, 2. Aufl. Linsbauers Handb. d. Pflanzenanat. 2.
- Zimmermann, A., 1922, Die Cucurbitaceen. H. 1 u. 2. Jena.

Mesogerron als zellphysiologisches Objekt

Von

Gertrude Kwiatkowsky

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 3 Textabbildungen

(Eingelangt am 11. Juni 1944)

Bei einer am 14. November 1943 von Prof. Höfler geführten Exkursion nach Moosbrunn (ungefähr 25 km östlich von Wien) sammelte ich zahlreiches Algenmaterial, das hauptsächlich eine mit leuchtend grünem Chromatophor versehene Fadenalge enthielt, die sich durch ihre kurzen rechteckigen Zellen und die plattenförmig axialen Plastiden mit anliegendem

Zellkern als *Mesogerron fluitans* (Brand) verriet. Wie ich dann anlässlich weiterer Exkursionen (8. Dezember, 18. Februar, 13. April) dorthin feststellen konnte, war besonders eine Stelle eines etwa 1 m breiten Wassergrabens, der mäßig fließendes, kalkreiches Wasser führte, mit diesen *Mesogerron*-Watten bedeckt, die in ihrem Auftreten sehr an das Vorkommen von *Spirogyra* erinnerten. Nur selten fand ich in diesen Proben noch irgendwelche andere Algenfäden, jedoch traten einige Meter flussabwärts wiederum größere Mengen von *Spirogyra* auf, daneben noch *Mougeotia* und *Zygnema*.

Bekanntlich ist die systematische Stellung von *Mesogerron* bis heute noch ungeklärt, und Pascher, Oltmanns, Printz nennen die Gattung sowohl im Anschluß an die Chlorophyceen wie auch im Anschluß an die Zygnemales.

Die Zellbreiten meines Moosbrunner Materials betrugen durchwegs 16 bis 17 μ , während die Längenmaße stark schwankten und an ein und demselben Faden das Doppelte, Dreifache und ausnahmsweise auch sogar das Vierfache der Breite betrugen. Die gesamte Fadenlänge überschritt bei meinem Material niemals die Maße von 20 bis 30 mm; dagegen konnte Brand (1899, S. 406) Fadenlängen bis zu einem halben Meter verzeichnen. Verzweigungen traten nicht häufig auf, doch habe ich solche doch vorgefunden, indem zwei nebeneinander gelegene Zellen schlauchförmig angewachsen waren.

Besonderes Interesse erweckt *Mesogerron* ob seiner Chromatophorenplatten, die man als mulden- oder schüsselförmige Chloroplasten zu bezeichnen pflegt, bei welchen die Ränder mehr oder weniger stark umgebogen sein können und oft auch Einkerbungen aufweisen. Die Plastiden liegen stets in der Längsachse der Zelle und erfüllen dieselbe in dieser Richtung ganz. In Küsters (1936) Beschreibung von *Mesogerron*, die auch für mein Wiener Material in jeder Hinsicht gelten kann, heißt es u. a.: „Der Plastid liegt in der Längsachse der Zelle und zerlegt ihr Lumen in zwei Halbzylinder; indem man die Fäden unter dem Mikroskope rollt, kann man sich davon überzeugen, daß der Chloroplast ein und derselben Zelle sich bald als grüne Platte zeigt, bald als schmaler Steg, ebenso wie es für den Chloroplasten der *Mougeotia*-Zellen allen Algologen längst bekannt ist.“

Die von Palla (1894) für *Mougeotiopsis* genauest beschriebene Plasmakonfiguration, die den axialen Plastiden durch plasmatische Fäden mit dem wandständigen Plasmabelag verbunden zeigt, haben weder Küster in seinem Münchner Material noch ich in meinem Wiener Material auffinden können; bei meinen zahlreichen plasmolytischen Versuchen wären mir solche Plasmakonfigurationen bestimmt nicht entgangen. Das spricht zusammen mit anderen Gründen wohl für die Richtigkeit der Ansicht Brands, der seinen *Mesogerron* mit Pallas früher beschriebener *Mougeotiopsis* keineswegs gleichstellt. Wie Küster (1936, S. 70) hervorhebt, unterscheidet sich *Mesogerron* von den fadenbildenden Konjugaten:

1. durch die klare Masse der Plastiden,
2. durch die Klarheit des Protoplasmas und insbesondere durch den Mangel an Gerbstoffbläschen,
3. durch den Pyrenoidmangel und
4. durch die geringe Neigung der Fäden, in Einzelzellen zu zerfallen.

Das Algenmaterial wurde im Kalthaus des Instituts in Originalwasser kultiviert (Temperatur 8 bis 10° C).

Näheren Aufschluß über die Chromatophorenbeschaffenheit sollten mir nachstehende Zentrifugierungsversuche geben. Ich unterwarf die *Mesogerron*-Fäden einer kräftigen Schleuderung, die von den Zellen ohne Schädigung ertragen wurde. Nach 30 bis 45 Minuten Zentrifugierung (3000 Umdrehungen, $r = 12,5$ cm) war der Chromatophor bei Längszentrifugierung, d. h. also bei Einwirkung der Fliehkraft in der Richtung der Längsachse, gegen den zentrifugalen Pol so weit zusammengeschoben, daß er ungefähr die Hälfte bis höchstens zwei Drittel der Zelle ausfüllte. Dabei erfuhr der Plastid vielfach Faltungen; der Kern war meist gänzlich verdeckt. Auch lang andauernde Schleuderung verursachte keine stärkeren Deformationen, wie etwa ein Einreißen des Chromatophoren (Abb. 1). Bei querzentrifugierten Zellen, die verhältnismäßig selten auftraten, war die Plastidenmasse ganz platt an die zentrifugale Zelllängswand angepreßt, wobei vom Kern nichts mehr zu sehen war.

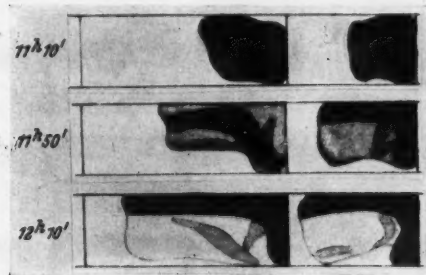


Abb. 1. Verhalten der Chromatophoren nach Zentrifugierung. Längszentrifugierte Zellen (25 Min., 3000 Umdrehungen).

Ließ ich nun das geschleuderte Material in Leitungswasser ruhig stehen, so ging die Rückverlagerung sehr rasch vor sich; dabei wurde der Plastid auseinandergezogen und alle durch die Schleuderung entstandenen Faltungen wieder geglättet; auch der Kern wurde wieder sichtbar. Die Zeit, die bis zur völligen Wiederherstellung der Plastiden nötig war, betrug an dem winterlichen wie auch an dem Frühjahrsmaterial eine halbe bis längstens zwei Stunden. Während der Rückverlagerung waren keine zytoplasmatischen Brücken oder Fäden, wie etwa bei Konjugatenzellen, wahrzunehmen. Da solche Bildungen bei Konjugatenzellen allgemein auftreten (Küster 1937; Eibl 1939, 1943; Toth, Graf, Richter 1943), liegt darin ein wesentlicher Unterschied im protoplasmatischen Verhalten des *Mesogerron* gegenüber den in dieser Hinsicht untersuchten Konjugaten. Vielfach wurden die Vorgänge durch eine Drehung des Plastiden kompliziert, die sich während der Rückverlagerung einstellte und die wohl mit dem noch zu besprechenden Einfluß des Lichtes auf die Chromatophorenlage zusammenhängt.

Es ist allgemein bekannt (Senn 1908), daß die Chromatophoren von *Mougeotia* Licht- und Schattenstellungen einnehmen. Daß auch *Mesogerron* in derselben Weise reagiert, hat Küster 1936 gezeigt. Auffällig ist hier nur, daß diese Reaktion außerordentlich rasch erfolgt. Solange die Lichtstärken keine allzu großen waren, nahm der Plastid,

unter dem Mikroskop gesehen, stets eine Senkrechtstellung seiner Längsachse zum Lichteinfall ein, wobei die gesamte Chromatophorenfläche dem Lichte zugekehrt wurde. Der Kern lag dabei ausnahmslos auf der konkaven Seite der Plastiden, die stets vom Lichte abgewandt war. Demnach ist im Falle der *Mesogerron*-Plastiden keinesfalls von einer physiologischen Gleichwertigkeit beider Chromatophorenseiten zu sprechen. Bei mittleren Lichtstärken erfolgte die Einnahme der Flächenstellung in einer ungefähren Zeitspanne von 20 bis 80 Minuten (Abb. 2 a—e). Die eingenommene Flächenstellung wurde nach Belichtung im Dunkel, bzw. Halbdunkel nicht mehr verändert. Dagegen trat bei grö-

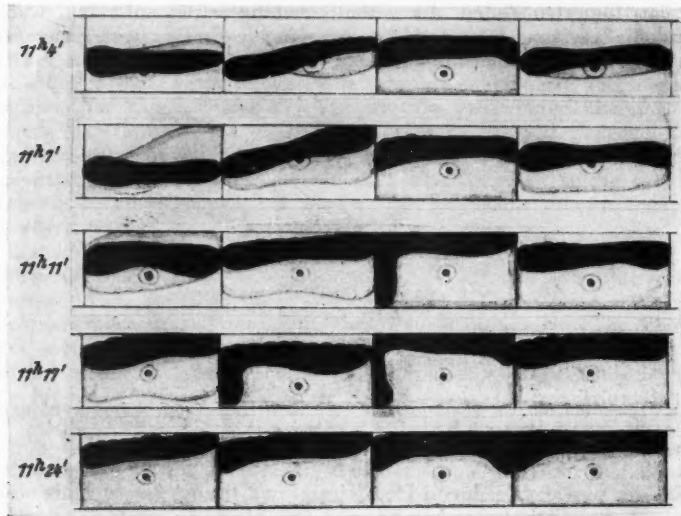


Abb. 2. *Mesogerron fluitans*, Chromatophorendrehung bei mittlerer Lichtstärke.

ßeren Lichtstärken gerade der umgekehrte Fall ein, indem die Plastiden von der Flächenstellung in die Kantenstellung rückten; jedoch ging diese Rückkehr zur Kantenstellung bedeutend langsamer vor sich als die Einnahme der Flächenstellung.

Um für all diese Versuche einen einseitigen Lichteinfall zu gewähren, fertigte ich mir ein innen schwarz ausgekleidetes Kästchen an, welches oben eine verschließbare Öffnung für das Objektiv, unten eine solche für die Lichtquelle und eine seitliche zur Handhabung des Präparates besaß. — Erwähnenswert ist noch, daß bei längerer Belichtung die Einkerbungen an den Chromatophorenrändern besonders auffällig waren, eine Tatsache, die wohl mit der CO_2 -Assimilation im Zusammenhang steht, wie dies bei lebhafter Assimilation für *Spirogyra* bekannt ist (Molisch, Abhandlungen, Bd. I, S. 174). Auch die von Küster 1936 festgestellten Plastidenverdrrehungen und -verbiegungen waren an meinem winterlichen Material sehr deutlich. Insbesondere traten bei längeren Zellen mehrmalige Verdrehungen dieser Art auf.

Bei allen zellphysiologischen Untersuchungen spielen Plasmolyseform und -verlauf eine große Rolle. Die *Mesogerron*-Zellen sind gut-plasmolysierbar. Ich verwendete für die folgenden Versuche Glukose, in Standortwasser oder in Wiener Leitungswasser gelöst. An dem ganz frischen winterlichen Material trat bei 0,5 Mol. Gluk. stets und in fast allen Zellen Eckenplasmolyse ein, während bei 0,45 Mol. kaum die Hälfte aller Zellen Eckenabhebungen zeigten. Demnach betrug der osmotische Wert hier ungefähr 0,40 bis 0,45 Mol. Bei den kurz zuvor geteilten Zellen lag der plasmolytische Grenzwert etwas höher, durchschnittlich bei 0,5 Mol. Gluk. In 0,6, bzw. 0,7 molaren Glukoselösungen traten alsbald konvexe Konturen auf (Abb. 3); dabei betrugen die Rundungszeiten, die je nach der Zelllänge schwankten, 8 bis 15 Minuten.

Nach fünftägiger Kultur waren an dem Material häufig verschiedene positive und negative Plasmolyseorte wahrzunehmen, die unabhängig von der Zutrittsrichtung des Plasmolytikums gewöhnlich eine bohnenförmige Gestalt des Protoplasten bewirkten. In vielen Fällen bildeten sich diese nach einigen Minuten zur normalen Endplasmolyse aus. Bei Plasmolyse erschienen die Ränder der Plastiden noch stärker eingerollt, der Kern war dadurch meist verdeckt. Ferner entstand durch die Verkürzung der Längsachse des Protoplasten ungefähr in der Mitte eine Faltung des Plastiden,



Abb. 3. Verhalten der Chromatophoren nach Plasmolyse (0,6 mol Glukose).

wobei dann von der den Zellkern bergenden Konkavseite vielfach eine Plasmabrücke sichtbar wurde, die ich aber nicht den von Palla beschriebenen Plasmakonfigurationen gleichstelle.

Die Harnstoff- und Glycerinversuche stellte ich in verschiedenen konzentrierten Lösungen an, die die gleichen Plasmolysenformen wie Glukose hervorriefen. Der Rückgang der Plasmolyse vollzog sich in gewohnter Weise; die plasmometrisch ermittelte Harnstoffaufnahme (aus 1,0 Mol.) betrug im Mittel 0,44 Mol. pro Stunde, Werte, denen ich aber, da das Material einige Zeit in Kultur gestanden war, keine endgültige Bedeutung beimesse. Die Chromatophoren, die bei Plasmolyse mehr oder weniger starke Faltungen und umgeschlagene Ränder aufwiesen, glätteten diese beim Plasmolyse-rückgang wieder vollkommen aus.

Die Behandlung mit Molischs Silbernitrat führte zu den gleichen Ergebnissen wie sie Küster beschrieb, nämlich zur schwärzlichen Färbung des gesamten Plastiden.

Literatur

- Brand, F., 1899, *Mesogerron*, eine neue Chlorophyceengattung. (Beibl. zur Hedwigia 38, 181.)
 — 1899, Über einen neuen Typus der Algenchromatophoren. Ber. d. D. Bot. Ges. 17, 406.
 Czurda, V., 1932, Zygnemales. Paschers Süßwasserflora Mitteleuropas, Heft 9.
 Eibl, K., 1939, Das Verhalten der *Spirogyra*-Chloroplasten bei Zentrifugierung. Protoplasma 33, 73.

- Küster, E., 1907, Über die Beziehungen der Lage des Zellkernes zu Zellenwachstum und Membranbildung. *Flora* 97.
- 1935, Die Pflanzenzelle. Jena.
- 1936, *Mesogerron* in Hessen. Ber. d. Oberhess. Ges. f. Natur- u. Heilkunde in Gießen 17, 65.
- 1937, Pathologie der Pflanzenzelle. II. Pathologie der Plastiden. Protoplasma-Monographien 13. Berlin.
- Molisch, H., 1918, Das Chlorophyllkorn als Reduktionsorgan. Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien, Abt. I, Bd. 127. Vgl. 1940, Molisch Abhandlungen, hgg. v. Höfler, G. Fischer, Jena.
- Oltmanns, F., 1922/23, Morphologie und Biologie der Algen, II. Aufl., Jena.
- Palla, E., 1894, Über eine neue pyrenoidlose Art und Gattung der Konjugaten. Ber. d. D. Bot. Ges. 12, 228.
- Printz, H., 1927, Die natürlichen Pflanzenfamilien, hgg. von Engler, II. Aufl., 3. Bd., Engelmann, Leipzig. (Vgl. S. 172, 374.)
- Senn, C., 1908, Die Gestalt- und Lageveränderungen der Pflanzenchromatophoren. Leipzig.
- Toth, A., Graf G. und Richter, G. 1943, „Plasmaamöben“ in geschleuderter *Spirogyra*. Protoplasma 37, 300.

Referate.

Ursprung, A., und G. Blum, Zum Nachweis einer nicht-osmotischen Saugkraft in lebenden Pflanzenzellen. Commentationes. Vol. XII, N. 2, 69—98.

C. Lyon (Plant Physiol. 17, 250, 1942) schloß aus der Diskrepanz zwischen den auf Grund der Saugkraftgleichung $Sz_n = Si_n - W_n$ und direkt mittels der Streifenmethode ermittelten Saugkraftwerten an Kartoffelknollen auf das Vorhandensein einer nicht-osmotischen Komponente der Saugkraft. Die Verfasser unterziehen die Messungen L y o n s einer kritischen Nachuntersuchung. Dabei ergab sich, daß die Differenzen entweder auf individuelle Verschiedenheiten oder, da auch solche in dem von Lyon angegebenen Ausmaße (25 Atm.!) nicht gefunden werden konnten, wahrscheinlich auf grobe Versuchsfehler zurückgehen; die Fehlerbreite beträgt bei Lyon bis über 20 Atm., das ist weit mehr als die behaupteten nicht osmotischen Kräfte (0—14,10 Atm.). Ohne die Möglichkeit eines Vorkommens solcher Kräfte in Abrede zu stellen, sehen die Verfasser in der Arbeit L y o n s keine geeigneten Argumente für ihr Vorhandensein erbracht.

O. Härtel (Graz).

Ursprung, A., und G. Blum, Die osmotischen Zustandsgrößen der Nadeln von *Pinus silvestris*. Commentationes. Vol. XI, N. 10, 465—643.
Citta del Vaticano: Pontificia Academia Scientiarum. 1947.

Pinus-Nadeln zeigen auffallende Abweichungen von der Saugkraftgleichung, indem die Saugkräfte der Zellen (Sz nach der Hebel-, Hartlaub- oder Streifenmethode) die des Zellinhaltes (Si nach der kryoskopischen, bzw. der Kapillarmethode und Grenzplasmolyse) weit übersteigen. Da Fehlerquellen in den Messungen am nächstliegenden erscheinen, unterziehen die Verfasser die verschiedenen Saugkraftmethoden einer kritischen Überprüfung. Dabei erwies sich das Paraffinöl innerhalb der Dauer der Messungen (von einigen Blütenblättern abgesehen) als indifferent; auch die von Hertel gefundenen Wirkungen des pH des Osmotikums ließen sich nicht reproduzieren. Quellungerscheinungen an Zellwänden und -inhalten sind wohl vorhanden, stören jedoch die Messungen keineswegs. Ebensovienig ließen sich trotz der anatomisch günstigen Verhältnisse keine Anhaltspunkte für besonders hohe Kohäsionsspannungen (Chu Chien Ren) finden, sie betragen höchstens einige wenige Atm. — An jungen, noch in der Scheide steckenden Nadeln ergibt sich mit den verschiedenen Methoden eine befriedigende Übereinstimmung von $Si > Sz$; sie bleibt auch an älteren Nadeln an ihrem basalen Teil weitgehend erhalten, während in den Spitzenpartien die mit dem Hebel ermittelten Sz_n -Werte sprunghaft bis auf 70 Atm. hinaufschellen, womit diese 35 Atm. über den mit der Kapillarmethode ermittelten Si_n -Werten liegen. In jungem Gewebe reagieren Assimilationsparenchym und Zentralzylinder gleichartig, während in den älteren Partien das Transfusionsgewebe nicht mehr reagiert (es wirkt nur mehr als Wasserspeicher), die Dickenänderungen also allein auf das Assimilationsparenchym zurückgehen. Sein Si -Wert (Preßsaft und Grenzplasmolyse) liegt gleichfalls über den Sz_n -Werten. Bei Durchschnittsbestimmungen über die ganze Nadel werden die Zellsäfte durch

das Transfusionsgewebe verdünnt und niedrige *Si*-Werte vorgetäuscht. Ähnlich ergeben sich mit der Kapillarenmethode an Preßsaft, bzw. Nadelbrei von *Pinus pinaster* Werte von 25 Atm., an ganzen Nadeln solche von 71 Atm. Die osmotischen Zustandsgrößen zeigen deutliche Schwankungen mit Regenmenge, Boden- und Luftfeuchtigkeit. — Bei dem methodisch so schwierigen Objekt konnte somit die Gültigkeit von $S_i > S_i > S_z$ erwiesen werden. Es wäre nun besonders interessant, wie sich die in vielen Messungen zahlreicher Autoren immer wieder gefundenen Unstimmigkeiten zwischen Saugkräften und osmotischen Werten auch an einfacheren Objekten aufklären lassen, da ja so ziemlich alle hiefür vorgebrachten Argumente nach den eingehenden kritischen Untersuchungen der Verfasser als Fehlerquellen nicht in Betracht kommen.

O. Härtel (Graz).

Lundegårdh, H., Growth, bleeding and salt absorption of wheat roots as influenced by substances which interfere with glycolysis and aerobic respiration. Ann. Agric. Coll. Sweden. Vol. 16, S. 339—371. 1949.

— **Quantitative relations between respiration and salt absorption.** Ebenda, Vol. 16, S. 372—403. 1949.

Die Zusammenhänge zwischen Wachstum, Wasserausscheidung und Salzaufnahme werden mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe an Weizenwurzeln untersucht. Jodessigsäure hemmt das Streckungswachstum unabhängig vom pH, bzw. der Dissoziation des Hemmstoffes; die durch das Jod bewirkte Wachstumsreaktion geht demnach von der Wurzeloberfläche aus. Erst nach einiger Zeit dringt Jodessigsäure ein, die dadurch hervorgerufenen Änderungen, z. B. Hemmung des Wassertransportes (Blutens), sind daher pH-abhängig (Permeation nur als Molekül möglich). Die Jodessigsäure (und ähnlich NaF) beeinflusst primär die anaerobe Glykolyse, bzw. die bei der Phosphorylierung tätigen Enzyme; auch bei völliger Hemmung des Wasserstromes, bzw. der Glykolyse ist noch ein Wachstum möglich, ebenso wie bei unterbundener Anionenatmung (durch HCN oder NaN_3 , die auf den Cytochrom-Cytochromoxydase-Komplex wirken). Es bestehen daher keine engen Zusammenhänge zwischen Wachstum und Wasserausscheidung einerseits und Anionenatmung andererseits. Volle Entwicklung ist selbstverständlich nur bei ungehindertem Funktionieren aller Vorgänge möglich; Störungen, bzw. Unterbrechungen der Reaktionsketten können offenbar durch „Umschaltungen“ innerhalb gewisser Grenzen ausgeglichen werden. — Für die Beurteilung der Zusammenhänge von Atmung und Salzaufnahme ist wesentlich, daß sich die Gesamtatmung der Wurzel aus drei Komponenten zusammensetzt. 1. Die Grundatmung (gleichmäßig über die ganze Wurzel sich erstreckend, gegen HCN bei neutraler Reaktion unempfindlich), 2. die Anionenatmung (bis etwa 60—80 mm hinter der Wurzelspitze, durch alkalisches KCN völlig gehemmt) und 3. die sogenannte „Dritte Atmung“, die sich nur in den ersten 10—30 mm hinter der Wurzelspitze findet und unempfindlich gegen alkalisches KCN ist, durch neutrales HCN jedoch völlig gehemmt wird. Über die Funktion der „Dritten Atmung“ ist noch nichts bekannt (Zusammenhang mit der besonderen Aktivität der Wurzelspitze?); für die Salzaufnahme kommt allein die Anionenatmung in Betracht. Der Quotient: aufgenommene Anionen/verbrauchter Sauerstoff beträgt theoretisch 4 (Robertson) und ist unter besonderen Bedingungen (hohe Salzkonzentration) auch realisierbar; in der normalen wachsenden Wurzel übersteigt er indes nie den Wert 1. Die Differenz zum theoretischen Wert wird mit der Mitbeteiligung der Atmung am Anionentransport im Innern des Gewebes (etwa $\frac{1}{4}$ der Gesamtatmung) und auf den Transport der „nativen Anionen“ (organische Anionen etwa die Hälfte der Gesamtatmung) erklärt. Diese beiden letzten Komponenten treten auch bei der Atmung in destilliertem Wasser, also bei Wegfall der Salzaufnahme, in Erscheinung.

O. Härtel (Graz).

Hasman, Muruvvet (Dept. Gen. Bot. Univ. Istanbul), **On polar water movement in osmotic systems.** Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul Sér. B, XIV, Fasc. 2, 77—113, 1949.

Gravimetrische und potentiometrische Messungen am Gewebe der Kartoffelknolle ergaben eine polare Permeabilität: der Wassereintritt verläuft in Traubenzucker-, KNO_3 - und CaCl_2 -Lösungen wesentlich rascher als die Exosmose. Durch Salze (und ähnlich auch Zucker, doch erwies sich der verwendete Zucker nicht als salzfrei) wird das Potential Gewebe — umgebende Lösung (bei aqua dest. —83 mV) verringert, wobei auch positive Ladungen auftreten; Ca wirkt etwa doppelt so stark als K. Die Ursache der Polarität wird daher nicht in einer anomalen osmotischen Komponente, sondern in polaren Strömungswiderständen gesehen; durch den direkten lyotropen Effekt und durch Veränderung des Minuspotentials werden die elektrostatischen Bremswiderstände der Wasserfäden in den Poren geändert. — Im Modellversuch wurde gleichfalls eine durch die Schwerkraft hervorgerufene elektroosmotisch bedingte Polarität des Wasserdurchtritts durch Cellophanscheiben gefunden.

O. Härtel (Graz).

Barth, L. G., Embryology. Mit 194 Abbildungen. 340 S. New York: Dryden Press. 1949. Dollar 5.—.

Wie der Autor in der Einführung sagt, handelt es sich hier zum ersten Male um den Versuch, die Embryologie auf biologischer Grundlage in Form eines Lehrbuches darzustellen. Es ist bemerkenswert, wie der Autor die schwierigen Probleme in kurzer, übersichtlicher Weise behandelt, so daß sie auch der Student mit geringeren morphologisch-embryologischen Vorkenntnissen verstehen kann.

In ausgezeichnet gegliederter Form und klarster Fragestellung wird die ganze Embryologie von der Reifung der Geschlechtszellen angefangen bis zur Geburt in ihren ursächlichen Zusammenhängen dargestellt. Jedes Kapitel beginnt mit einer kurzen morphologisch-embryologischen Beschreibung des betreffenden Stadiums, dann werden die sich aus der morphologischen Entwicklung ergebenden ursächlichen Fragen angeführt und schließlich nach dem heutigen Stand der Forschung in kurz zusammengefaßter Form beantwortet.

Teils werden überdies die für die Experimente verwendeten Tiere anatomisch-embryologisch an Hand schematischer Zeichnungen beschrieben, so daß sich auch der weniger in die Materie Eindringene leicht orientieren kann. Besonders erwähnenswert scheint mir die glückliche Wahl der Versuchstiere und die Beigabe übersichtlicher, einfachster Schemata, die dem Studierenden oft mehr sagen als photographische Wiedergaben.

Aber auch für den jungen Arzt ist das Buch von Interesse, denn es wird nicht nur das Problem der Organisatoren und der induzierenden Wirkung der embryonalen Gewebe und Substanzen behandelt, sondern es werden auch die Auswirkungen der Kenntnisse embryonaler Vorgänge chemischer Natur auf den erwachsenen Körper geschildert; so auf das Problem der Regeneration, der Geschwulst- und Mißbildungen. Anschließend folgt die Erörterung der weitgehenden Möglichkeiten, die sich in der Zukunft für die Behandlung pathologischer Erscheinungen ergeben.

Da sich aber viele entwicklungsmechanische Probleme auch bis zu einem gewissen Grade auf die Pflanze anwenden lassen, so ist dieses Buch auch für den Botaniker wertvoll. Insbesondere sind es hier die kurzgefaßten erbbiologischen Fragen mit ihrer Wechselwirkung zwischen Gen und Plasma, die von Interesse sein dürften.

So kommt dieser Embryologie eine ganz allgemeine Bedeutung als Lehrbuch biologischer Fächer zu, dem wir in deutscher Sprache nichts Gleichwertiges an die Seite zu stellen haben. Angenehm fällt die sehr einfache,

klare Ausdrucksweise auf, welche dem Studenten mit geringen Kenntnissen des Englischen das Lesen erleichtert.

Schließlich möchte ich noch erwähnen, daß dem jungen Forscher hier ein Mittel in die Hand gegeben ist, sich in Kürze über die wichtigsten modernen embryologischen Probleme zu informieren. Das manches vielleicht in einer etwas zu sicheren Art dargestellt ist, entspricht der Bestimmung des Werkes als Lehrbuch.

D. Boerner (Graz).

Heilbrunn, L. V., and Wilson, W. L., The effect of heparin on cell division. Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 70, 179 (1949).

Nach der Auffassung von Heilbrunn handelt es sich bei seiner Oberflächenpräzipitationsreaktion, bei der Protoplasmakoagulation, bei der Blutgerinnung und bei der Viskositätssteigerung während der Zellteilung vor der Spindelbildung um einander ähnliche Erscheinungen. Diese Auffassung wird durch den Befund gestützt, daß Heparin, das die Blutgerinnung hemmt, auch die Teilung befruchteter Eier von *Chaetopterus* hemmt, wobei es die sonst eintretende Viskositätssteigerung verhindert.

K. Umrath (Graz).

Holm-Jensen, Ib., Krogh, August, und Wartiovaara, Veijo, Some experiments on the exchange of potassium and sodium between single cells Characeae and the bathing fluid. Acta Bot. Fennica 36, 1 (1944).

Die Verfasser berichten über Bestimmungen der absoluten Permeationskonstanten der Na- und K-Ionen, ausgeführt an den Riesenzellen zweier Characeen, nämlich *Tolypellopsis stelligera* und *Nitella mucronata*. Ein wesentlicher Zug bei diesen Bestimmungen lag darin, daß ein stationärer Zustand hinsichtlich des Ionenaustausches vorhanden war, so daß die in der Zeiteinheit aus den Zellen stattfindende Exosmose von Ionen durch die gleichzeitige adenoide Aufnahme einer entsprechenden Ionenmenge kompensiert wurde. Die Permeationskonstante des Kaliumions wurde unter diesen Bedingungen zu etwa 3×10^{-5} cm/Stunde im Falle von *Tolypellopsis* und zu etwa $0,8 \times 10^{-5}$ cm/Stunde im Falle von *Nitella* bestimmt. Für das Natrium betragen die entsprechenden Werte etwa 1×10^{-5} (*Tolypellopsis*), bzw. etwa 1×10^{-6} (*Nitella*). Diese Werte sind kleiner als die an ähnlichen Objekten ermittelten Permeationskonstanten etwa des Erythrits und der Arabinose, dagegen etwa von derselben Größenordnung wie die mutmaßlichen Permeationskonstantenwerte der nur noch unmeßbar langsam permeierenden Hexosen.

Runar Collander (Helsingfors).

Chambers, R., Micrurgical studies of protoplasm. Biological Review 24, 246—265.

Der Meister der Mikrurgie gibt in diesem Bericht eine ausgezeichnete Vorstellung über die Mannigfaltigkeit der Probleme, zu deren Lösung mikrurgische Arbeiten beigetragen haben. Das Sammelreferat gliedert sich in folgende Abschnitte: Relation between nucleus and cytoplasm. Structural components of the protoplasm. Miscibility of protoplasm with water. Internal osmotic pressure. An electrolytic solution compatible with cytoplasm. Extraneous coats. Hyaluronidase. The plasma membrane. The hydrogen-ion concentration of the cell interior. The action of salts on the interior of protoplasm. Living and dying protoplasm. Relation of structure to one-way permeability.

Weber (Graz).

Küster, E., Über die Abhängigkeit der Zellkernlage von der Zellenform. Ber. Deutsch. Botan. Ges. 62 (1949).

Bei hufeisenähnlich gebogenen Zellen (vor allem Epidermiszellen des Spaltöffnungsapparates) vieler Pflanzen fällt die sich regelmäßig wieder-

holende Lage des Zellkernes an der Konkavseite auf. Küster hat schon 1907 die Ansicht geäußert, daß diese Lagerung physikalisch bedingt sei. Bünning meint (1948) dagegen, daß speziell bei den Schließzellen von diesen ausgehende chemische Wirkungen für die Lagerung der Kerne verantwortlich sind. Küster verteidigt auf Grund ausgedehnter Beobachtungen seine Auffassung. Auf Chemotaxis zurückführbare Bewegungen von Kern und Cytoplasma seien reversibel. Dagegen ist die an Küsters Objekten festgestellte Kernlage bleibend. Versuche an *Nephrolepsis*, durch Zentrifugierung die Kerne aus ihrer Konkavflankenstellung zu entfernen, schlugen fehl. Gegen den physikalischen Erklärungsversuch der Kernlage in den Stomata-Nebenzellen von *Tradescantia* spricht sich Weissböck (1949) auf Grund seiner Beobachtungen an colchizinierten Blättern aus. Weber (Graz).

Wartiovaara, Veijo, Über die Temperaturabhängigkeit der Protoplasma-permeabilität. Annales Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. Vanamo, Tom. 16, No. 1. 1942. — **Derselbe, The permeability of *Tolypellopsis* cells for heavy water and methylalcohol.** Acta Bot. Fenn. 54, 1—22. 1944. — **Derselbe, The permeability of the plasma membranes of *Nitella* to normal primary alcohols at low and intermediate temperatures.** Physiol. Plantar. 2, 184—196. 1949.

In der ersten der obengenannten Arbeiten hat der Verfasser den Temperaturkoeffizienten der Permeation von acht recht verschiedenartigen Analektrolyten (Harnstoff, Glycerin, Urethylan, Trimethylcitrat, Hexamethylenetetramin und drei Glykolen) genau untersucht. Als Hauptversuchsobjekt dienten die Riesenzellen der Characee *Tolypellopsis stelligera*. Unter Benutzung einer ingeniiösen Untersuchungsmethode hat Verf. Ergebnisse erzielt, die zu den genauesten auf diesem Gebiet gehören. Ein besonderer Vorzug seiner Technik liegt u. a. darin, daß mit einer und derselben Zelle zahlreiche sukzessive Permeabilitätsbestimmungen (etwa bei verschiedenen Temperaturen oder mit verschiedenen Stoffen) ausgeführt werden können. Die Temperaturabhängigkeit der Permeation erwies sich als sehr groß, zugleich aber als von Stoff zu Stoff recht verschieden. Die Q_{10} -Werte der untersuchten Substanzen variierten nämlich zwischen 2,6 (Harnstoff) und 5,9 (2,3-Butylenglykol). Im Falle des Hexamethylenetetramins wurde sogar der extrem hohe Wert 9,2 erhalten, doch mag dieser vielleicht gewissen Fehlerquellen zuzuschreiben sein. Zwischen der Größe des Temperaturkoeffizienten und der Lipoidlöslichkeit oder dem Permeationsvermögen der betreffenden Verbindung besteht keine nachweisbare Korrelation. Dagegen zeigte es sich, daß alle untersuchten Verbindungen, deren Molekülgröße eine bestimmte Grenze unterschreitet ($M_{RD} < 15$), einen bedeutend niedrigeren Temperaturkoeffizienten hatten als größermolekulare Verbindungen. Bei Temperaturen zwischen 0 und 30° C erwies sich der Temperaturkoeffizient als nur in geringem Grade abhängig von der Temperatur. Falls sich die Struktur der Plasmahaut mit der Temperatur ändert, findet diese Veränderung also kontinuierlich, nicht sprungweise, statt. Die Permeabilitätsänderungen waren im allgemeinen völlig reversibel. — Auf S. 98 ff. gibt Verf. eine beachtenswerte Kritik der Vorstellung, daß die Plasmahaut von wassererfüllten Poren durchsetzt sei.

In der zweiten hier zu besprechenden Untersuchung hat Verf. es unternommen, die Durchlässigkeit der Protoplasten von *Tolypellopsis* für schweres Wasser (HDO) und Methanol möglichst exakt zu bestimmen. Da diese Verbindungen außerordentlich schnell permeieren, sind die meisten bisherigen Bestimmungen ihrer Permeationsgeschwindigkeit nicht sehr genau. Die vom Verf. in der zuerst genannten Arbeit ausgearbeitete Technik bewährte sich aber auch hier. Wichtig war u. a., daß der Widerstand der Zellwand

an abgetöteten Zellen experimentell bestimmt und bei der Berechnung der Resultate berücksichtigt wurde. Ein weiterer Mangel der früheren Messungen der Wasserpermeabilität besteht darin, daß der zu studierende Vorgang — wohl eigentlich irrtümlicherweise — als ein Filtrationsprozeß aufgefaßt worden war und daß man das Meßergebnis dementsprechend in ganz anderen Einheiten ausgedrückt hat als bei sonstigen Permeationsversuchen, bei denen es sich ja um Diffusionsvorgänge handelt. Dieser Schwierigkeit ist der Verf. ausgewichen, indem er anstatt mit gewöhnlichem Wasser mit schwerem Wasser experimentierte, das offenbar eben durch Diffusion die Plasmahäute passiert. (Die Permeabilität der Protoplasten für HDO ist etwas, aber, wie es scheint, nur recht wenig niedriger als diejenige für H_2O .) In dieser Weise gelangte er zu Werten der Wasser- und Methanolpermeabilität der nackten Protoplasten, die mit den Permeationskonstanten anderer Verbindungen direkt vergleichbar sind. Es zeigte sich, daß HDO 20 000mal schneller als Glycerin und 2000mal schneller als Harnstoff durch die untersuchten Protoplasten permeiert. Sein Permeationsvermögen ist mehrere hundertmal größer als dasjenige von Substanzen gleicher Lipoidlöslichkeit, aber größeren Molekularvolumens. Die Permeationskonstante des Methanols ist etwa gleich groß wie diejenige des schweren Wassers. Sie ist etwa zehnmal größer als diejenige von größermolekularen Substanzen gleicher Lipoidlöslichkeit.

In seiner dritten Arbeit geht Verf. in der Untersuchung der Alkoholpermeabilität der Protoplasten und ihrer Temperaturabhängigkeit ein Stück weiter. Den Ausgangspunkt bildet hier die von Danielli und Davson aufgestellte Hypothese, wonach nur diejenigen Moleküle, deren kinetische Energie einen gewissen Schwellenwert überschreitet, die Lipoidschicht der Plasmahaut zu durchdringen vermögen. Und zwar soll dieser Schwellenwert um so höher liegen, je weniger lipoidlöslich die betreffende Verbindung ist. Hienach müßten die Temperaturkoeffizienten der Permeation der Lipoidlöslichkeit antibat sein. Bereits die Ergebnisse der zuerst genannten Arbeit Wartiovaaras zeigten deutlich, daß diese Antibasie jedenfalls nicht ausnahmslos vorhanden ist. In der jetzt zu besprechenden Arbeit hat er mit ähnlicher, aber noch weiter verfeinerter Technik die äußerst schnelle Permeation des Methanols, Äthanols, Propanols und Butanols bei 0 und 20° C untersucht. Die Temperaturkoeffizienten der vier untersuchten Alkohole erwiesen sich als innerhalb der Fehlergrenzen identisch (Q_{10} = etwa 2,5—2,7). Hier scheint also weder die Molekülgröße noch die Lipoidlöslichkeit eine Rolle zu spielen. Verf. schließt denn auch, daß die in der ersten Untersuchung beobachtete Symbasie zwischen Molekularvolumen und Temperaturkoeffizient zum großen Teil zufällig war. Dagegen ist die Größe des Temperaturkoeffizienten wahrscheinlich abhängig von der Arbeit, die nötig ist, um die zwischen den Wassermolekülen und den Molekülen der permeierenden Verbindung bestehenden Wasserstoffverbindungen zu sprengen. Da die Festigkeit dieser Bindungen im Falle der vier untersuchten Alkohole etwa gleich groß sein dürfte, so versteht man, daß auch ihre Temperaturkoeffizienten gleich groß gefunden wurden. Unter den untersuchten Alkoholen permeiert Äthanol am langsamsten, Metanol ein wenig schneller, Propanol und besonders Butanol erheblich schneller. Scheinbar macht sich also hier ein Molekülsiebeeft bemerkbar. Verf. zieht jedoch eine andere Deutung vor. Er nimmt nämlich an, daß die räumliche Orientierung der permeierenden Moleküle einen wichtigen Faktor darstellt, der die Wahrscheinlichkeit herabsetzt, daß ein Molekül die Lipoidschicht der Plasmahaut beim Aufprallen penetriert. Der Einfluß des Orientierungsfaktors dominiert um so mehr, je länger und je asymmetrischer die permeierenden Moleküle sind, d. h. je größer ihr transversales Trägheitsmoment ist.

Runar Collander (Helsingfors).

Virgin, H. L., Changes in the Viscosity of the Cytoplasm of *Helodea densa* Casp. during Continuous Illumination. *Physiologia Plantarum* 1. (1948).

Die Cytoplasma-Viskosität von *Helodea*-Blättern, die 72 Stunden hindurch dunkel gehalten werden, zeigt durchwegs konstanten Wert. Wird darauf mit Licht verschiedener Intensität, das nur sichtbare Strahlen enthält, bestrahlt, so lassen sich mit Hilfe der Zentrifugierungsmethode folgende Viskositätsänderungen ermitteln: Die Viskositätsänderungen sind nicht proportional der Lichtintensität, doch lassen sich drei Intensitätsbereiche ausfindig machen, in denen das Cytoplasma in bestimmter gleicher Weise reagiert. Bei Intensitäten von 2200 bis 22 000 Lux findet zunächst eine vorübergehende kräftige Viskositätszunahme statt. Diese ist nur von ganz kurzer Dauer (5 Sekunden), darauf folgt ein rapides Absinken der Viskositätskurve. Die Viskositätsabnahme hält bei Dauerbelichtung mehrere Stunden an. Bei Bestrahlung mit 25 bis 2200 Lux ist die erste Reaktion ebenfalls eine Viskositätszunahme (am stärksten bei ca. 100 Lux), bei Dauerbeleuchtung hält sich die Viskosität dauernd auf gleicher Höhe. Bei 0,5 bis 25 Lux ist auch die Initialreaktion eine Viskositätsabnahme; sie stellt sich schon bei 1 Minute Belichtung ein. Die Viskositätsabnahme hält bis zu 4 Stunden an.

Weber (Graz).

Reuter, Lotte, Zur protoplasmatischen Anatomie des Keimblattes von *Soja hispida*. *Osterr. Botan. Z.* 95. (1948).

Das Mesophyll des Keimblattes von *Soja*, das aus morphologisch fast gleichartigem Grundgewebe besteht, eignet sich ganz besonders zu Untersuchungen im Sinne der protoplasmatischen Pflanzenanatomie. Die vorliegende Studie, die eine wertvolle Bereicherung der Literatur dieser 1930 begründeten Arbeitsrichtung darstellt, charakterisiert die Zellen auf Grund ihrer protoplasmatischen Eigenschaften wie Beschaffenheit und Lage der Plastiden, Größe, Lage und Gestalt der Kerne, Plasmakonfiguration, Plasmolyse-Verhalten, Plasmolyse-Resistenz, osmotischer Wert, Verhalten bei Vitalfärbung, Resistenz gegen Salze, Äther, Permeabilität. Im Blatt wurde neben den bereits bekannten Longitudinalgradienten auch das Vorhandensein von Transversalgradienten aufgezeigt. Weiter werden Beziehungen zwischen den Stoffwechselvorgängen und den protoplasmatischen Eigenschaften klargelegt und schließlich zellphysiologische Veränderungen beim Vergilbungsprozeß aufgedeckt. Die Ergebnisse der Arbeit sind sehr mannigfaltig und regen zu weiteren Untersuchungen an.

Weber (Graz).

Prat, H., Histo-physiological gradients and plant organogenesis. *Botanical Review* 15. (1948).

Die Bedeutung dieser Zusammenfassung geht dadurch weit über die eines nur referierenden Sammelberichtes hinaus, weil sie die Arbeiten eines reich verzweigten, aber noch nicht von einheitlichen Gesichtspunkten betrachteten Grenzgebietes zwischen Histologie und Zellphysiologie in erfolgreicher Synthese vereint. Die Erschwerung der wissenschaftlichen Zusammenarbeit im letzten Jahrzehnt hat es wohl mit sich gebracht, daß dabei die Publikationen der verwandten Richtung der protoplasmatischen Pflanzenanatomie, von denen, wie die Übersicht von Reuter (1949) zeigt, bereits eine stattliche Zahl vorliegt, überhaupt keine Berücksichtigung finden, obwohl sie ja vielfach die gleichen Probleme behandeln, wie das Review von Prat. Dieses zerfällt in folgende Abschnitte: I. General concept of a system of gradients in living organisms: The concept of gradients in physics; its first applications to biological sciences. Classification. Expression of gradients in the different systems of coordinates. Interactions between gra-

dients. II. Physico-chemical gradients: Chemical gradations. Gradations of carbohydrates. Ionic gradients. Electric gradients. Redox Gratiens. Hydration Gradient. Osmotic Pressure and suction gradients. III. Physiological gradients: Gradients of metabolism. Gradients of sensitivity to heat and desiccation. Gradients of resistance against parasitic organisms. IV. Auxetic gradients: Growth and Development. Polarized cell-senescence. Mitotic gradients. Elongation gradients and biometric gradations.

F. Weber (Graz).

Reuter, L., Protoplasmatische Pflanzenanatomie. Phytion 1 (1949).

Der Überblick über die Entwicklung, die die „Protoplasmatische Pflanzenanatomie“ seit ihrer Begründung (1929) genommen hat, zeigt eine Orientierung nach drei Richtungen: I. Protoplasmaphysiologische Kennzeichnung einzelner Zelltypen; II. Protoplasmaphysiologische Kennzeichnung einzelner Gewebearten; III. Protoplasmaphysiologische Analyse einzelner Organe. In dieser Gruppierung wird die Literatur unter folgenden Abschnitten besprochen: ad I: 1. Drüsenzellen, 2. Stomata-Zellen, 3. Nebenzellen, 4. Endodermis-Zellen. ad II: 1. Hautgewebe, 2. Grundgewebe, 3. Stranggewebe, 4. Kontraktils Gewebe, 5. Meristematisches Gewebe. ad III: 1. Thallus, 2. Blatt, 3. Stamm, 4. Wurzel. Dieser erste Bericht über die Erfolge dieser Forschungsrichtung ist um so willkommener, weil er von einer Autorin stammt, die selbst Wichtiges und Wesentliches zum Ausbau der protoplasmatischen Pflanzenanatomie beigetragen hat. F. Weber (Graz).

Locquin, M., L'utilisation du rayonnement β du radium pour l'étude des courants protoplasmiques dans les plasmodes de myxomycètes. Trav. Botaniques dédiés à René Maire. Alger. 1949.

In geeigneter Dosierung beschleunigen β -Strahlen die Cytoplasmaströmung in den Plasmodiumsträngen von *Fuligo septica*. Wird durch Bestrahlung mit UV-Strahlen im corticalen Cytoplasma ein Mikrotrauma ausgelöst, so färbt sich die geschädigte Partie rot. Diese dadurch markierte Protoplasmapartie tritt in das in Strömung befindliche zentrale Cytoplasma über; ist die gefärbte Partie stäbchenförmig, so wäre zu erwarten, daß sich das Stäbchen mit der Längsachse parallel zur Richtung der Strömung stellt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Das Stäbchen wird quergestellt fortbewegt. Das uns fließend erscheinende zentrale Cytoplasma dürfte demnach nicht flüssigen, sondern festen Aggregatzustand besitzen und nur eine subcorticale Zone ist verflüssigt und ermöglicht das Gleiten des zentralen Teiles des Cytoplasmastranges. Diese Beobachtung scheint mit der Vorstellung von Seifriz, wonach der axiale Anteil der Plasmodienstränge flüssig ist und durch Kontraktion des corticalen Teiles fortbewegt wird, nicht vereinbar zu sein.

Weber (Graz).

Bernert, T., Die künstliche Radioaktivität in Biologie und Medizin.

Eine gemeinverständliche Einführung. Mit 27 Textabb. Wien: Springer-Verlag. 1949. VI, 85 S. S 18.—, sfr. 7.80, 1.80 Dollar, DM 6.—.

Die bei Atomkernprozessen auftretenden radioaktiven Isotope ermöglichen, bestimmte Stoffe zu „markieren“ und ihren Weg im Organismus zu verfolgen. Seitdem die Darstellung der Isotope in den Uranbatterien in größerem Maßstabe möglich ist, hat diese Methode einen großen Aufschwung und stete Verfeinerung erfahren. Der Standort der meisten Atom-batterien jedoch hat zur Folge, daß die Erfahrungen größtenteils in der amerikanisch-englischen Literatur niedergelegt sind. Angesichts der nunmehr möglichen Versendung radioaktiver Isotope auch nach Übersee, ist es sehr zu begrüßen, wenn mit vorliegendem Büchlein ein kurzer, jedoch das

Wesentliche erfassender Überblick über die Verwendung der radioaktiven Isotope in Biologie und Medizin gegeben wird, und zwar unter Berücksichtigung der Literatur bis 1948. — Nach einer zwar knappen, aber dennoch klaren Einführung in die kernphysikalischen Voraussetzungen und die Methoden der Isotopendarstellung, werden die Indikatorenmethode, die Methode der Radiographie sowie die der stabilen Isotope erläutert. Im II. Teil werden an Hand ausgewählter Beispiele einige Probleme (Permeabilität, P-, Fe-, Eiweiß- und Kohlehydratstoffwechsel), die durch die Radioindikatorenmethode entscheidend gefördert werden konnten, kurz besprochen, im III. Teil sind einige Anwendungsmöglichkeiten in der medizinischen Diagnostik und Therapie kurz skizziert. Eine Tabelle im Anhang gibt ein Verzeichnis der Eigenschaften der bei biologischen Fragenstellungen bisher verwendeten Isotope und ihrer Anwendungsmöglichkeiten, im Literaturverzeichnis werden einige zusammenfassende Arbeiten zum weiteren Studium angeführt. Eine Schrift, die gleicherweise den Arzt, Chemiker, Physiker, Biologen, den Lehrer wie den gebildeten Laien über ein zukunftsreiches Forschungsgebiet unterrichtet.

O. Härtel (Graz).

Geitler, L., Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung.

Mit 13 Textabb. Dritte, umgearb. u. erweit. Aufl. V, 35 S. Wien: Springer-Verlag. 1949. S 15.—, sfr. 6.50, \$ 1.50, DM 4.80.

In unserer Zeit, in der selbst der Forscher keine Zeit hat für zeitraubende Methoden, wirbt schon der Titel dieser ausgezeichneten Schrift für sich. „Schnellmethoden“, das ist es ja, was die Wissenschaft heute vielfach sucht, und so greifen Karyologen, Genetiker, Züchter gern nach dem kleinen Buch, nehmen es zur Hilfe und sind dabei sicher, daß ihnen darin wirklich geholfen wird. So einfach die Schnellmethoden auch sind, so müssen doch auch sie gelernt werden, und Geitler ist dazu der allerbeste Lehrer. Er hat diese Methoden in zahlreichen eigenen Untersuchungen mit bestem Erfolg angewendet, hat sie zur Vollkommenheit ausgebildet, kennt ihre Leistungsfähigkeit und Leistungsgrenzen. Das Büchlein wurde in der 3. Aufl. durch wichtige Zusätze bereichert, und in einem neuen Abschnitt findet man willkommene Hinweise auf besonders geeignete Objekte. Jeder, der die karyologischen Schnellmethoden anwenden will, wird sich durch diese Schrift leiten lassen, denn sie erspart vermeidbare Mißerfolge. Der Protoplasmatiker freut sich, daß in dem der Fixierung und dem fixierten Objekt gewidmeten Büchlein doch auch ein Abschnitt über „Lebenduntersuchung“ nicht fehlt.

F. Weber (Graz).

Hofmeister, L., Über die Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit. Sitzber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 157, H. 1/5, 83—95, 1949.

Sie ist anzuwenden, wo die Genauigkeit der plasmometrischen Methodik nicht nötig und die Bearbeitung umfangreichen Materials erwünscht ist. Die Methode läßt, kritisch angewandt, auch die Bestimmung von Permeationskonstanten zu, nach der Gl. $P'_a = \frac{120(C-O)}{T(C-O)}$, wo T die Deplasmolysezeit in Minuten, C die Konzentration des Osmotikums und O der osmotische Wert der Zelle ist. Der Augenblick der Deplasmolyse ist dann anzunehmen, wenn der rückgedehnte Protoplast scharfe Zellecken noch nicht ausfüllt. Vergleichende Parallelversuche an 24 Objekten nach der Deplasmolysezeit- und der plasmometrischen Methode gaben gute Übereinstimmung, die allermeisten P'_a -Werte lagen zwischen 116% und 87% der plasmometrischen Kontrollen. Auch ein Partialverfahren der Permeabilitätsbestimmung aus der Deplasmolysezeit wird vorgeschlagen.

Höfler (Wien).

Hofmeister, L., Vitalfärbungsstudien mit Chrysoidin. Über Permeabilität und Quellung vitalgefärbten Plasmas. Ebenda, 157, H. 1/5, 55—82, 1949.

Verf. hat früher (Zeitschr. wiss. Mikr., 55, 393) die Wirkung der Vitalfärbung mit Neutralrot und Methylenblau auf die Permeabilität des Plasmas für Harnstoff und Glycerin studiert. Schwache Färbung wirkte dort nicht oder nur unwesentlich, starke, mit Farbkrümelbildung verbundene, hemmte die Permeabilität. — Das Chrysoidin färbt nun das Plasma selbst und nimmt auf seine Eigenschaften unmittelbaren Einfluß: es verändert die Permeabilität. Bei Zwiebelepidermen von *Narzissus*, einem Zellobjekt mittlerer Harnstoffdurchlässigkeit, bewirkt die vital-reversible Chrysoidinfärbung Aufquellung des Plasmas und allgemeine Vakuolenkontraktion; die Permeabilität für Harnstoff wird erhöht, u. zw. auf das Zwei- bis Fünffache der Kontrollen. Bei Blattstielepidermen der Kartoffelpflanze und der Karotte, welche nach Biebls Vorgang als Vertreter des rapiden Harnstofftyps gewählt wurden, wird umgekehrt die Permeabilität für Harnstoff bedeutend herabgesetzt (z. B. auf 7 bis 25% der Kontrolle), während die Glycerin-, Erythrit- und Malonamiddurchlässigkeit gefördert erscheint; bei diesen Plasmen bewirkt die Färbung keine Aufquellung, sondern eine leichte Entquellung („Erstarrung“). — In methodischer Hinsicht ist von Interesse, daß Phosphatpufferung zu vermeiden war. Wurde die Farblösung mit Brunnenwasser (pH 7,5) angesetzt, so vertrugen die Schnitte nachher die Dauerplasmolyse, während gemeinsame Wirkung von Puffer, Färbung und Diosmotikum vor Ende des Permeabilitätsversuches zum Tode oder zu deutlicher Schädigung führte. Wurde an gefärbten Schnitten durch Dauerwässerung der Farbstoff wieder entfernt, so war nachher die ursprüngliche Permeabilität wieder völlig hergestellt, und dies auch nach starker Plasmafärbung, wo sofortige Plasmolyse zum Tod der Zellen geführt hätte. — Die Versuche sind so exakt und kritisch durchgeführt und stützen sich auf so große Messungsreihen, daß die Ergebnisse völlig gesichert erscheinen und in künftiger Diskussion über Plasmafragen verwertbar sind. Die theoretischen Deutungsmöglichkeiten werden vom Verf. schon jetzt, mit der gebotenen Zurückhaltung, diskutiert. Für den auffälligsten Effekt, die erhöhte Harnstoffpermeabilität beim gequollenen *Narzissus*-Plasma, möchte er einen teilweisen Übergang von der Lösungs- zur Porenpermeation im Sinn der Lipoidfiltertheorie annehmen.

Höfler (Wien).

Drawert, H., Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen II. Zeitschr. Naturforschung, 4 b, H. 1, 35—37, 1949.

Bei Methylenblau liegt das Färbevermögen in Abhängigkeit von der Azidität des Farbbades grundsätzlich so wie beim Neutralrot und anderen Basenfarbstoffen; doch kommt als weiteres Moment die durch die Wasserstoffionenkonzentration bedingte chemische Umwandlung des Farbstoffes selbst hinzu. Wie in der Protoplasma-Monographie von Brooks (1941) dargetan, liegt bei niederem pH das stark dissoziierte Methylenblau selber vor, bei höherem pH das schwach dissoziierte Trimethylthionin, das wohl vorwiegend von der Zelle aufgenommen wird. Irrig sind Literaturangaben, wonach die Methylenblaufaufnahme lebender Zellen durch Elektrolyte bzw. deren Kationen wesentlich beeinflusst werden soll. Nur die Zellwandfärbung wird in bekannter Weise durch Salzzusatz unterbunden. Wo aber das Methylenblau wirklich im Zellinneren gespeichert wird, da haben Elektrolyte auf Permeationsvermögen und Speicherung des Farbstoffes keinen merklichen Einfluß.

Höfler (Wien).

Pfeiffer, Hans H. Polarisationsmikroskopische Messungen an Mikrosporenmutterszellen von <i>Tradescantia paludosa</i>	277
Küster, Ernst. Über die Lagerung der Chromoplasten (Beobachtungen an pflanzlichen Haaren).....	282
Kwiatkowski, Gertrude. <i>Mesogerron</i> als zellphysiologisches Objekt	289
Referate.....	295

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Diannelidis, Themistokles. Zellphysiologische Beobachtungen an den Schließzellen von <i>Stratiotes aloides</i>	23. 12. 1943
Wittmann, H. Untersuchungen zur Dynamik einiger Lebensvorgänge von <i>Amoeba sphaeronucleolus</i> (Greeff) bei natürlichem „Zeitmoment“ und unter Zeitraffung.....	19. 7. 1944
Germ, H. Ein Fall spontaner Plasmasystrophe.....	13. 11. 1948
Stiegler, Adolf. Vitalfärbungen an Pflanzenzellen mit Chresylechtviolett....	16. 4. 1949
Wilson, Walter L. The Effect of Roentgen Rays on Protoplasmic Viscosity Changes During Mitosis.....	8. 11. 1949
Keller, Rudolph, and Barney V. Pisha. The Electric Factor of Cancer Protoplasm	21. 12. 1949
Hofmeister, Lothar. Eine einfache Apparatur für quantitative Mikroinjektion, nebst Bemerkungen über plasmatische Injektion	7. 1. 1950
Lindner, Erich. Zellphysiologische Resistenzuntersuchungen an Ruderal-, Wiesen- und Kulturpflanzen	4. 1. 1950
Tasaki, Ichiji, and Noburô Kamiya. Electrical Response of a Slime Mold to Mechanical and Electrical Stimuli	6. 2. 1950
Linser, Hans. Die zellstreckende Wirkung einiger Phenoxyessigsäurederivate im Pastentest	8. 2. 1950
Härtel, Otto. Wirkungen von Ionen auf die Wasserdurchlässigkeit des primären und sekundären Hautgewebes pflanzlicher Organe	18. 2. 1950
Kamiya, Noburô. The Protoplasmatic Flow in the Myxomycete Plasmodium as Revealed by a Volumetric Analysis	7. 3. 1950
Seemann, Felix. Der Einfluß der Wärme und UV-Bestrahlung auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas	9. 3. 1950
Cholnoky, B. J. Über farbstoffführende Zellen der <i>Nemeisa strumosa</i> -Blütenblätter.....	24. 3. 1950
Kelly, John W. The Localisation of a Metachromatic Substance in the <i>Chaetopterus</i> Egg.....	31. 3. 1950
Heilbrunn, L. V., and W. L. Wilson. The Prevention of Cell Division by Anti-Clotting Agents	3. 4. 1950
Pfeiffer, Hans H. Untersuchungen an Lipoidtropfen in Explantaten in vitro	8. 4. 1950
Meyer, Paul. Natürliche Vitalfärbung bei <i>Hydra attenuata</i> (Kurze Mitteilung)	22. 4. 1950
Toth, Annemarie. Mikurgische und mikrochemische Untersuchung der festen Anthocyankörper im Blütenblatt von <i>Pelargonium zonale</i> (Kurze Mitteilung)	2. 5. 1950
Ferner, Ernst Siegfried. Die intravitale Fluorochromierung junger Blätter von <i>Helodea densa</i> (Ein Beitrag zur weiteren Aufklärung der entwicklungsphysiologisch bedingten Farbgradienten).....	6. 5. 1950
Bancher, Engelbert. Mikurgische Studien an <i>Delphinium</i> Anthocyanophoren (Kurze Mitteilung).....	11. 5. 1950
D'Amato, Francesco. The Quantitative Study of Mitotic Poisons (Sammelreferat)	24. 5. 1950

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Chromosoma

Zeitschrift für Zellkern- und Chromosomenforschung

Herausgegeben von H. Bauer, Wilhelmshaven, T. Caspersson, Stockholm, C. D. Darlington, London, Th. Dobzhansky, New York, L. Geitler, Wien, A. Müntzing-Lund, F. Oehlkers, Freiburg i. Br., F. Schrader, New York, J. Seiler, Zürich

Soeben erschien:

3. Band, 5. Heft

(Abgeschlossen im Dezember 1949)

Mit 151 Textabbildungen, 91 Seiten. S 64.—, sFr. 20.—, * 4.60, DM 19.—

Inhalt: Ruch, Fr. Über den Schraubenbau der meiotischen Chromosomen — Linnert, Gertrud. Untersuchungen über die Cytologie polyploider Pflanzen II. — Matsuura, H. Chromosome Studies on *Trillium Kamtschaticum* Pall. and its Allies. XVIII. The Role of the Kinetochore in Trivalent Formation. — Matsuura, H. Chromosome Studies on *Trillium Kamtschaticum* Pall. and its Allies. XXII. Critical Evidence of the Spiral Theory of Crossing-Over. — Harte, Cornelia. Mutationsauslösung durch Ultrakurzwellen.

Zeitschrift

für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Herausgegeben von W. Bargmann, Kiel, und J. Seiler, Zürich

Soeben erschien:

35. Band, 1.—2. Heft

(Abgeschlossen im Dezember 1949)

Mit 71 Textabbildungen, 175 Seiten. S 94.—, sFr. 29.60, * 6.80, DM 28.60

Inhalt: Petry, G. Die Konstruktion des Eierstockbindegewebes und dessen Bedeutung für den ovariellen Typus. — Hild, W. Zur Frage der Neurosekretion im Zwischenhirn der Schleie (*Tinca vulgaris*) und ihrer Beziehungen zur Neurohypophyse. — Creutzfeldt, W. Experimentelle Untersuchungen über die Regenerationsfähigkeit des Inselapparates (Pankreasresektion am alloxandiatetischen Hund). — Rötheli, A. Chemische Beeinflussung plasmatischer Vorgänge bei der Meiose des Tubifex-Eies. — Eichardt, Helga. Zur Kenntnis der cytologischen Vorgänge an den Geschlechtszellen von *Arianthus arbustorum* während ihrer Reifungs- und Reifephase, unter besonderer Berücksichtigung des jahreszeitlichen Rhythmus. — Ferner, H., und W. Stoeckenius jr. Die Cytogenese des Inselsystems beim Menschen.

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von L. Geitler, Wien

Soeben erschien:

Band XCVI, 3. und 4. (Schluß-) Heft

(Abgeschlossen im Dezember 1949)

Mit 21 Textabbildungen, 198 Seiten. S 96.—, sFr. 28.70, * 6.60, DM 27.70

Inhalt: Leonhardt, R. Phylogenetisch-systematische Betrachtungen. — Kraus, G. Morphologisch-anatomische Untersuchung der entwicklungsbedingten Veränderungen an Achse, Blatt und Fruchtknoten bei einigen Beerenfrüchten. — Schlagorsky, M. Das Bauprinzip des Primulaceengynözeums bei der Gattung *Cyclamen*. — Regel, C. Klimaänderung und Vegetationsentwicklung im eurasiatischen Norden. — Janke, A. Der Abbau der Zellulose durch Mikroorganismen. — Troll, W. Über die Grundbegriffe der Wurzelmorphologie. — Baum, H. Beiträge zur Kenntnis der Schildform bei den Staubblättern. — Geitler, L. Beiträge zur Kenntnis der Auxosporenbildung pennater Diatomeen. — Schiller, J. Über die Schale und den Bau der Pyrenoide bei *Trachelomonas intermedius*. — Janchen, E. Versuch einer zwanglosen Kennzeichnung und Einteilung der Früchte.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

